

LAMINIINIT JA NIIDEN TEHTÄVÄT KEHITTYVÄSSÄ
KESKUSHERMOSTOSSA
SEKÄ
KDI-TRIPLEPTIDIN NEUROPROTEKTIIVINEN VAIKUTUS
6-HYDROKSIDOPAMIINILLA INDUSOIDUSSA PARKINSONIN TAUTI
MALLISSA

Tommi Ala-Kurikka
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmakologian ja
toksikologian osasto
elokuu 2013



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Farmasian tiedekunta		Laitos/Institution – Department Farmakologian ja toksikologian osasto	
Tekijä/Författare – Author Tommi Ala-Kurikka			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Laminiinit ja niiden tehtävät kehittyvässä keskushermostossa sekä KDI-tripeptidin neuroprotektiivinen vaikutus 6-hydroksidopamiinilla indusoidussa Parkinsonin tauti mallissa			
Oppiaine / Läroämne – Subject Farmakologia			
Työn laji/Arbetets art – Level Pro gradu		Aika/Datum – Month and year elokuu 2013	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 91
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>Laminiinit ovat joukko solunulkoisia, heterotrimeerisiä glykoproteiineja, jotka esiintyvät pääasiassa osana tyvikalvojen molekyyliverkkoja. Ne vuorovaikuttavat monien muiden soluväliaineen molekyylien sekä solukalvon reseptorien, kuten integriinien ja α-dystroglykaanin kanssa ja osallistuvat yksilönkehityksen aikana lukuisiin morfogeneettisiin ja organogeneettisiin tapahtumiin sekä kudusrakenteiden ja kudorajapintojen ylläpitoon.</p> <p>Laminiinit vaikuttavat kaikkiin keskushermoston pääkehitysvaiheisiin hermostoputken sulkeutumisesta synaptogeneesiin. Niiden ekspressio keskushermostossa vähenee kehityksen päätyttyä mutta sen on todettu lisääntyvän vaurioalueilla trauman tai sairauden seurauksena. Koska laminiinien tiedetään voimistavan neuriittien kasvua ja tukevan neuronien selviytymistä, on tämän arveltu olevan regeneraation käynnistämiseksi tarkoitettu vaste. Vaikka endogeenisen laminiinin vaikutukset ovat vaurioiden korjaamiseksi selvästi riittämättömät, saattaisivat laminiineista johdetut molekyylit toimia tehokkaina lääkeaineina.</p> <p>γ1-laminiinin neuriittien kasvua parantava fragmentti, KDI-tripeptidi on aikaisemmissa <i>in vivo</i> tutkimuksissa osoittautunut tehokkaaksi neuroneita suojelevaksi ja regeneraatiota parantavaksi yhdisteeksi. Näiden tulosten rohkaisemana lähdin tutkimaan pystyisikö KDI suojelemaan myös keskiaivojen dopaminergisia neuroneita toispuoleisessa, 6-hydroksidopamiinilla indusoidussa Parkinsonin tauti -mallissa rotilla. KDI (1-30 μg) injisoitiin striatumiin kuusi tuntia ennen 6-hydroksidopamiinia. Muodostuvan vaurion suuruutta arvioitiin mittaamalla D-amfetamiinilla indusoitua pyörimiskäyttäytymistä 2, 4 ja 6 viikkoa leesioinnin jälkeen sekä määrittämällä substantia nigra <i>pars compacta</i> solumäärä ja striatumin optinen tiheys tyrosiinihydroksylaasi-värjätystä leikkeistä viikolla seitsemän.</p> <p>Ainoa tehokas KDI-annos oli 3 μg:aa. Kontrolliin verrattuna se vähensi merkittävästi rottien D-amfetamiinilla indusoitua pyörimiskäyttäytymistä viikolla neljä. KDI-peptidi ei kuitenkaan säästänyt substantia nigra <i>pars compacta</i> tyrosiinihydroksylaasia ekspressoivia, dopaminergisia neuroneita tai niiden striatumin aksoneja. KDI-tripeptidi saattaisi olla käyttökelpoinen yhdiste Parkinsonin taudin hoidossa, mutta sen vaikutus ei näyttäisi perustuvan dopaminergisten neuronien suojelemiseen tai niiden aksonien haarautumisen tehostamiseen. Koska KDI:n tiedetään salpaavan ionotrooppisia glutamaattireseptoreja, saattaa se parantaa motorista suorituskkyä hillitsemällä Parkinson-oireita pahentavan, yliaktiivisen subalamisen tumakkeen toimintaan.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords KDI, laminiini, soluväliaine, Parkinsonin tauti, 6-hydroksidopamiini, neuroprotektio			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Farmasian tiedekunta, Farmakologian ja toksikologian osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Ohjaaja: Marjo Piltonen			



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Pharmacy		Laitos/Institution– Department Division of Pharmacology and Toxicology	
Tekijä/Författare – Author Tommi Ala-Kurikka			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Laminins and their roles in central nervous system development and the neuroprotective properties of KDI-tripeptide in 6-hydroxydopamine induced Parkinson's disease model			
Oppiaine /Läroämne – Subject Pharmacology			
Työn laji/Arbetets art – Level Master's thesis		Aika/Datum – Month and year august 2013	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 91
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>Laminins are a family of heterotrimeric glycoproteins found mainly in basement membranes. They interact with numerous other extracellular matrix components and cell surface receptors, including integrins and α-dystroglycan. Laminins play roles in myriad of functions including tissue morphogenesis, organogenesis, maintenance of tissue integrity and compartmentalization.</p> <p>In central nervous system laminins are involved in every major developmental stage from neural tube closure to synaptogenesis. Laminin expression in central nervous system decreases after maturation but has been found inducible by injury after trauma or disease. Since laminins are known to promote neurite outgrowth and neuronal survival, this has been proposed as a regenerative response to injury. Although the effects of endogenous laminin are clearly inadequate for repair, laminin based compounds could be powerful therapeutic agents.</p> <p>In previous <i>in vivo</i> studies KDI-tripeptide, a neurite outgrowth promoting fragment from γ1-laminin, has proved effective neuroprotective and regeneration promoting compound. Encouraged by these results I set out to test whether KDI would rescue midbrain dopaminergic neurons in unilateral 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. KDI (1-30 μg) was injected to the striatum six hours prior to 6-hydroxydopamine. The severity of the lesion was then evaluated by measuring D-amphetamine induced rotation 2, 4 and 6 weeks post-lesion and by assessing the number of neurons in substantia nigra <i>pars compacta</i> and optical density of striatum after tyrosine hydroxylase immunostaining at week seven.</p> <p>The only effective KDI dose studied was 3 μg. Compared to control it decreased D-amphetamine induced rotational behaviour significantly at week four. KDI, however, failed to save tyrosine hydroxylase positive dopaminergic neurons in substantia nigra <i>pars compacta</i> or their axons in striatum. KDI might be usable in treating Parkinson's disease but it's mode of action doesn't appear to rely on protecting dopaminergic neurons or promoting the branching of their axons. KDI is known to inhibit ionotropic glutamate receptors and could therefore improve motor function by opposing striatal denervation induced overactivity of glutamatergic subthalamic nucleus neurons.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords KDI, laminin, extracellular matrix, Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, neuroprotection			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Faculty of Pharmacy, Division of Pharmacology and Toxicology			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisor: Marjo Piltonen			

SISÄLLYSLUETTELO

I KIRJALLISUUSKATSAUS: LAMINIINIT JA NIIDEN TEHTÄVÄT KEHITTYVÄSSÄ KESKUSHERMOSTOSSA

1	JOHDANTO.....	1
2	LAMINIINIT JA NIIDEN RAKENNE.....	2
3	LAMINIINIEN BIOSYNTESI, POLYMERISAATIO JA SITOUTUMINEN.....	7
4	LAMINIINIT KESKUSHERMOSTON KEHITYKSESSÄ.....	10
4.1	Hermostoputken sulkeutuminen.....	11
4.2	Neurogeneesi ja migraatio.....	12
4.3	Aksonien kasvu.....	19
4.4	Myelinaatio.....	21
4.5	Synaptogeneesi ja synaptinen plastisuus.....	24
5	YHTEENVETO.....	28

II KOKEELLINEN OSA: KDI-TRIPEPTIDIN NEUROPROTEKTIIVINEN VAIKUTUS 6-HYDROKSIDOPAMIINILLA INDUSOIDUSSA PARKINSONIN TAUTI MALLISSA

6	JOHDANTO.....	30
7	TUTKIMUKSESSA KÄYTETTYJEN MENETELMIEN VALINTA.....	34
7.1	6-hydroksidopamiini-malli.....	34
7.2	Ungerstedtin pyörimismalli.....	36
7.3	Tyrosiinihydroksylaasi-immunohistokemia.....	37
8	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	38
8.1	Käytetyt materiaalit.....	38
8.2	Liuosten valmistus.....	39
8.2.1	Stereotaktisessa leikkauksessa käytetyt liuokset.....	39
8.2.2	Perfuusiossa käytetyt liuokset.....	39
8.2.3	Immunohistokemiassa käytetyt liuokset.....	40
8.3	Koe-eläimet.....	41
8.4	Stereotaktinen leikkaus sekä KDI- ja 6-OHDA-infusiot.....	41
8.5	Pyörimiskoe.....	45
8.6	Perfusointi.....	46
8.7	Immunohistokemia.....	47
8.7.1	Aivoleikkeet.....	47
8.7.2	TH-värijäys.....	47
8.7.3	Solulaskenta.....	49
8.7.4	Optinen tiheys.....	50
8.8	Tilastollinen analyysi.....	51
9	TULOKSET.....	51
9.1	Amfetamiinilla indusoitu pyörimiskäyttäytyminen.....	51
9.2	Tyrosiinihydroksylaasia ekspressoivien solujen määrä substantia nigra <i>pars compactassa</i>	53
9.3	Striatumin optinen tiheys.....	56
10	TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA.....	57

10.1	KDI-tripeptidi vähentää amfetamiinilla indusoitua pyörimistä.....	58
10.2	KDI-käsittely ei vaikuta substantia nigra pars compactan tyrosiinihydroksylaasia ekspressoivien solujen määrään.....	60
10.3	KDI ei suojele striatumin dopaminergisia aksoneja.....	65
11	YHTEENVETO.....	67
12	KIRJALLISUUSLUETTELO.....	69

LYHENTEET

6-OHDA	6-hydroksidopamiini
ABC	avidiini-biotiini-kompleksi
AMPA	α -amino-3-hydroksi-5-metyyli-isoksatsoli-4-propionihappo
CPP	3-[(\pm)-2-karboksi-piperatsin-4-yyli]-propyyli-1-fosfonaatti
CR	Cajal-Retzius
DAB	diaminobentsidiini
GDNF	gliasolulinjasta peräisin oleva neurotrooppinen tekijä
KDI	lysiini-asparagiinihappo-isoleusiini
LTD	pitkän aikavälin synaptinen depressio
LTP	pitkän aikavälin synapsitoiminnan voimistuminen
MGP	mediaalinen <i>globus pallidus</i>
MPP ⁺	1-metyyli-4-fenyylipyridinium
MPTP	1-metyyli-4-fenyyl-1,2,3,6-tetrahydropyridiini
NBQX	2,3-dihydroksi-6-nitro-7-sulfamoyyli-bentso[f]kinoksaliini
NMDA	N-metyyli-D-aspartaatti
NMJ	hermo-lihasliitos
NRG-1	neureguliini-1
OD	optinen tiheys
OPC	oligodendrosyytin esiaste
PB	fosfaattipuskuri
PBS	fosfaattipuskuroitu saliini
PD	Parkinsonin tauti
PDGF	verihiutalekasvutekijä
RGC	radiaalinen gliasolu
SNpc	substantia nigra <i>pars compacta</i>
SNpr	substantia nigra <i>pars reticulata</i>
STN	subtalaminen tumake
SVZ	subventrikulaarinen alue
TH	tyrosiinihydroksylaasi
TH-IR	tyrosiinihydroksylaasi-immunoreaktiivisuus
VZ	ventrikulaarinen alue

I KIRJALLISUUSKATSAUS: LAMINIINIT JA NIIDEN TEHTÄVÄT KEHITTYVÄSSÄ KESKUSHERMOSTOSSA

1 JOHDANTO

Laminiinit ovat joukko solunulkoisia, heterotrimeerisiä glykoproteiineja, jotka esiintyvät pääasiassa osana tyvikalvojen molekyyliverkkoja (Miner 2008). Tyvikalvot ovat epiteeli- ja endoteelisolukerroksia, verisuonia, keskushermostoa sekä monia muita kudoksia ympäröiviä, erikoistuneita soluväliaineen muodostamia levyjä (Timpl ja Brown 1996). Ne rakentuvat laminiinien ja tyypin IV kollageenin muodostamista polymeereistä, joita yhdistävät nidogeeni, perlekaani ja useat muut molekyylit. Muiden soluväliaineen molekyylien lisäksi laminiinit sitoutuvat useisiin solukalvon reseptoreihin kuten integriineihin ja α -dystroglykaaniin (Miner ja Yurchenco 2004; Miner 2008). Laminiiniperheen jäsenten monimuotoisuudesta johtuen tyvikalvojen rakenne ja vuorovaikutukset solujen kanssa vaihtelevat niiden laminiinikoostumuksen mukaan. Osana tyvikalvoja laminiinit osallistuvat yksilönkehityksen aikana lukuisiin morfogeneettisiin ja organogeneettisiin tapahtumiin sekä ylläpitävät kudusrakenteita ja kudusraja-alueita.

Keskushermostossa varsinaiset tyvikalvot rajoittuvat yleensä ottaen verisuonia ympäröivään ja pehmeäkalvon alaiseen soluväli-alueeseen (Colognato ym. 2005). Näiden rakenteiden ulkopuolella laminiinit esiintyvät organisaatioltaan yhä puutteellisesti tunnetuissa matrikseissa. Vaikka tyvikalvojen ulkopuoliset laminiinit eivät tyvikalvoissa esiintyvien laminiinien tavoin näytä toimivan rakenteellisissa tehtävissä, on niiden osoitettu osallistuvan useiden keskeisten keskushermoston kehitystapahtumien

säätelyyn. Tämä kirjallisuuskatsaus keskittyy laminiinien rakenteen ja interaktioiden kuvaamiseen sekä laminiinien tehtäviin kehittyvässä keskushermostossa.

2 LAMINIINIT JA NIIDEN RAKENNE

Laminiinit ovat trimeerejä ja koostuvat yhdestä α - β - ja γ -proteiinialayksiköstä. Muodoltaan ne muistuttavat ristiä ja painavat 400-900 kDa. Ensimmäinen laminiini eristettiin hiiren Engelbreth-Holm-Swarm sarkooman tuottamasta tyvikalvosta vuonna 1979 (Timpl ym. 1979). Sittenmin nisäkkäistä on löydetty viisi α -, kolme β - ja kolme γ -alayksikköä, jotka muodostavat ainakin 16 erilaista laminiinitrimeeriä (Aumailley ym. 2005). Isoformien ekspressiomallit poikkeavat sekä ajallisesti että sijainnillisesti, mikä viittaa siihen, että isoformit toimivat toisistaan eroavissa tehtävissä (Miner 2008). Vaikka kaikki alayksiköt eivät kykene sitoutumaan toisiinsa ja muodostamaan toimivaa laminiini-molekyyliä, on löydettyjen laminiini-isoformien määrä pienempi kuin mahdollisten alayksikköyhdistelmien määrä (Macdonald ym. 2010). Näin ollen on todennäköistä, että useat isoformit odottavat yhä löytämistään. Perinteisesti laminiinit on nimetty Burgesonin ja kumppanien (1994) esittämällä tavalla niiden löytymisjärjestyksessä laminiini-1–15. Laminiinitrimeerien rakenteen tarkastelun helpottamiseksi käytän tässä työssä Aumailleyn ja kumppanien (2005) ehdottamaa päivitettyä nimistöä, jossa laminiinin nimi muodostuu sen alayksikkökoostumuksen mukaan. Esimerkiksi laminiini-111 muodostuu alayksiköistä α 1, β 1 ja γ 1 ja laminiini-423 alayksiköistä α 4, β 2 ja γ 3. Molemmat nimistöt on koottu taulukkoon 1. Laminiiniketjuja koodaavien geenien nimiin viitataan yhä yleisesti käytössä olevan Burgesonin ja kumppanien (1994) esittämän nimistön mukaisesti. Geenin nimi alkaa *LAM*-kirjaimilla, joiden jälkeen tulee geenin koodaaman proteiinialayksikön nimi roomalaisilla kirjaimilla. Esimerkiksi *LAMA4*, *LAMB2* ja *LAMC1* koodaavat alayksikköjä α 4, β 2 ja γ 1.

Taulukko 1: Laminiini-isoformit ja niiden alayksikkökoostumus.

Laminiini-isoformit ¹		Alayksiköt	Lähdeviite
Burgeson ym. 1994	Aumailley ym. 2005		
laminiini-1	laminiini-111	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	Timpl ym. 1979
laminiini-2	laminiini-211	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	Ehrig ym. 1990
laminiini-3	laminiini-121	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	Engvall ym. 1990
laminiini-4	laminiini-221	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	Engvall ym. 1990
laminiini-5	laminiini-332 / -3A32	$\alpha 3A\beta 3\gamma 2^2$	Rousselle ym. 1991
laminiini-5B	laminiini-3B32	$\alpha 3B\beta 3\gamma 2^2$	Rousselle ym. 1991
laminiini-6	laminiini-311 tai 3A11	$\alpha 3A\beta 1\gamma 1^3$	Marinkovich ym. 1992
laminiini-7	laminiini-321 tai 3A21	$\alpha 3A\beta 2\gamma 1^3$	Champlaud ym. 1996
laminiini-8	laminiini-411	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	Miner ym. 1997
laminiini-9	laminiini-421	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	Miner ym. 1997
laminiini-10	laminiini-511	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	Miner ym. 1997
laminiini-11	laminiini-521	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	Miner ym. 1997
laminiini-12	laminiini-213	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	Koch ym. 1999
laminiini-13	laminiini-323	$\alpha 3\beta 2\gamma 3^4$	Libby ym. 2000
laminiini-14	laminiini-423	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	Libby ym. 2000
laminiini-15	laminiini-523	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	Libby ym. 2000

¹Taulukoitujen laminiinien lisäksi laminiini-333:n, -212/222:n ja -522:n olemassaolosta on viitteitä (Yan ja Cheng 2006; Durbeej 2010).

²Laminiini-ketjut $\alpha 3A$ ja $\alpha 3B$ ovat *LAM43*:n silmukointi varianteja (Ryan ym. 1994).

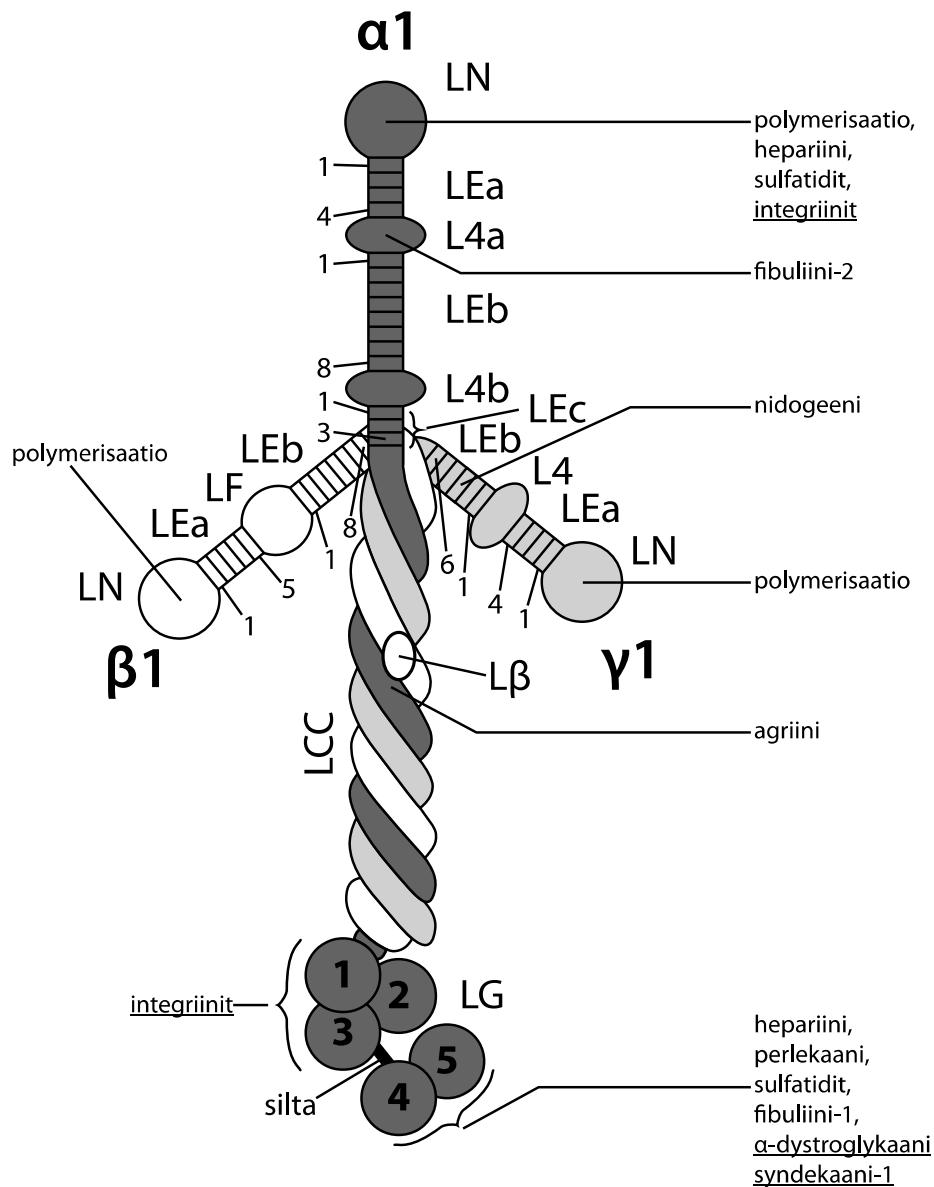
³Laminiini- $\alpha 3B\beta 1\gamma 1$ tai - $\alpha 3B\beta 2\gamma 1$ ei toistaiseksi ole osoitettu esiintyvän.

⁴Ainoa osoitus olemassaolosta on ketjujen yhtäaikainen ekspressio. Isoformin muodostumista ei ole pystytty osoittamaan *in vitro* (Macdonald ym. 2010).

Laminiinitrimeerien yleisrakenne on isoformista riippumatta sama. Käytän rakenteen esittelyyn ensimmäisenä löydettyä ja rakenteeltaan parhaiten tunnettua laminiini-111:stä (kuva 1.) (Timpl ym. 1979). Laminiinin α - β - ja γ -ketjut ovat järjestäytyneet ristin muotoon siten, että ristin pitkä sakara muodostuu kaikkien ketjujen C-terminaalisten osien yhteenliittymästä ja lyhyet sakarat yksittäisten ketjujen N-terminaalisista osista (Sasaki ja Yamada 1987; Sasaki ym. 1987, 1988; nimistö Aumailley ym. 2005). Laminiiniketjut muodostuvat lukuisista, erillisistä proteiinirakenteista, domeeneista.

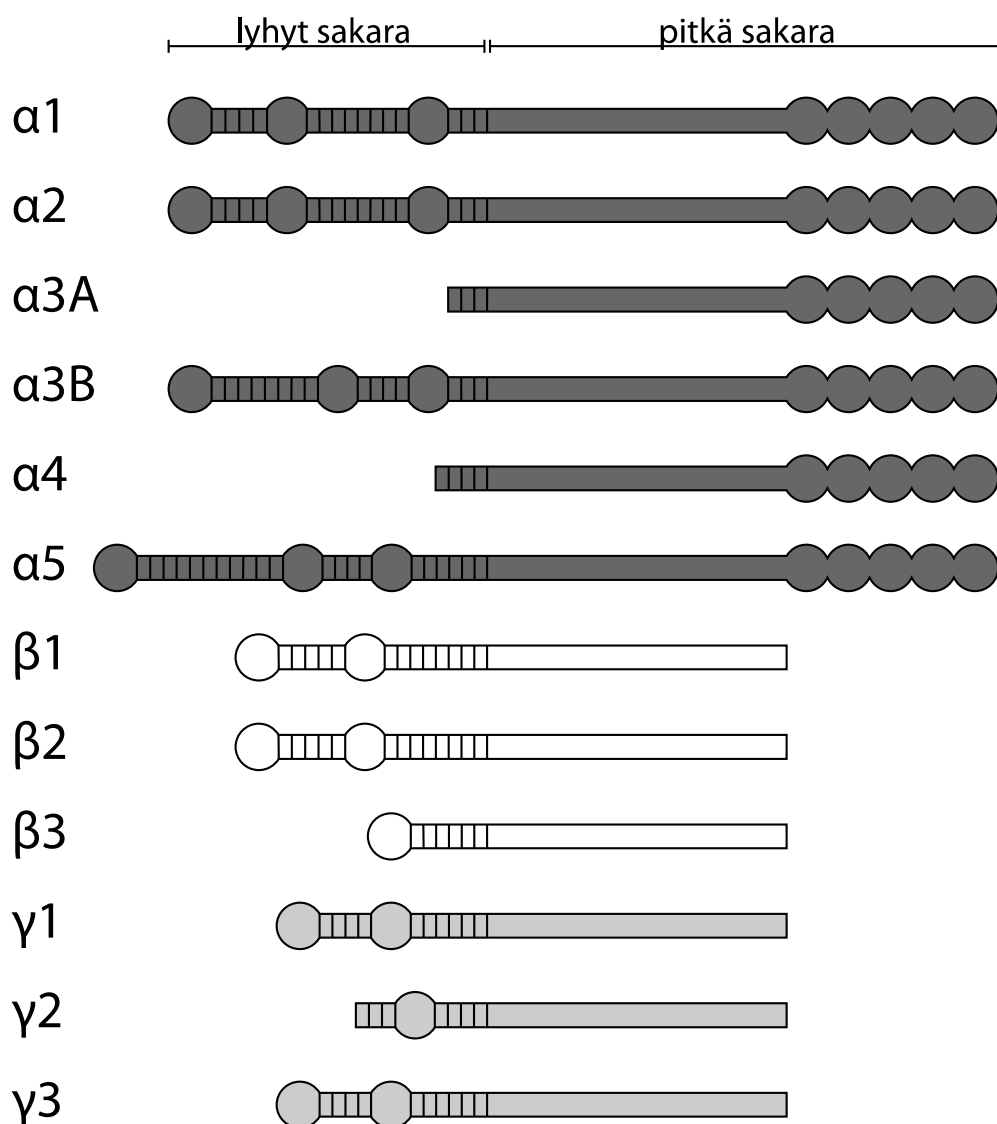
Laminiini-111:n jokainen ketju alkaa N-terminaalisella, pallomaisella LN-domeenilla. LN-domeenia seuraavat vuorotellen sauvamaiset LE-domeenit ja pallomaiset L4- tai LF-domeenit. LE-domeenit muodostuvat vaihtelevasta määrästä epidermaalisen kasvutekijän kaltaisia, runsaasti kysteiinitähteitä sisältäviä, toistojaksoja. L4- ja LE-domeenien määrä vaihtelee ketjusta toiseen. Ne erotetaan a-c-kirjaimin aloittaen nimeäminen N-terminaalisesti päästä. LE-domeenien yksittäiset epidermaalisen kasvutekijän kaltaiset jaksot numeroidaan vastaavalla tavalla. Laminiinin pitkässä sakarassa eli LCC-domeenissa proteiiniketjut esiintyvät toistensa ympärille kiertyneinä α -kierteinä, joita sitovat ketjujen väliset disulfididisidokset (Beck ym. 1993). Ainoa keskeytys tässä α -kierteiden muodostamassa kierteessä on β -ketjun LCC-domeenin ulkopuolelle työntyvä, n. 30 aminohappotähteen silmukka, L β (Sasaki ym. 1987). β - ja γ -ketjut päättyvät LCC-domeeniin (Sasaki ja Yamada 1987; Sasaki ym. 1987). α -ketjun C-terminaalinen pää muodostaa viisi pallomaista domeenia (LG1-5), jotka LG3:n ja LG4:n välistä siltaa lukuunottamatta ovat järjestäytyneet peräkkäin (Sasaki ym. 1988; Tisi ym. 2000).

25-27 % hiiren Engelbreth-Holm-Swarm sarkoomasta eristetyn laminiini-111:n painosta on LCC-domeenin pinnalle kiinnittyneitä hiilihydraatteja (Knibbs ym. 1989; Dean ym. 1990). Laminiinin hiilihydraatit muodostuvat muiden glykoproteiinien hiilihydraatteihin verrattuna poikkeuksellisen monimuotoisesta oligosakkaridijoukosta ja näyttäisivät osallistuvat laminiinin biologisiin tehtäviin.



Kuva 1: Lamiiniini-111:n rakenne, nimitys ja muiden soluväliaineen molekyylien sekä reseptorien sitoutumiskohdat. Lamiiniini-ketjujen nimet, $\alpha 1$, $\beta 1$ ja $\gamma 1$ on merkitty ketjujen N-terminaalisiin päihin. LN=N-terminaalinen globulaarinen domeeni; LE=sauvamainen, epidermaalisen kasvutekijän kaltaisista toistojaksoista muodostuva domeeni; L4/LF=globulaarinen domeeni; LCC= α -, β - ja γ -ketjujen α -kierteiden muodostama kierre; L β =LCC:n ulkopuolelle työntyvä β -ketjun osa; LG1-5= α -ketjun c-terminaaliset, globulaariset domeenit; silta=LG3- ja LG4-domeeneja yhdistävä silta. Saman ketjun LE- ja L4-domeenit erotetaan kirjaimin aloittain nimeäminen N-terminaalisesta domeenista. Lisäksi LEa-c-domeenien epidermaalisen kasvutekijän kaltaiset domeenit numeroidaan aloittain N-terminaalisesta suunnasta alkaen. Solukalvon reseptorien nimet on alleviivattu (Nimeämiskäytäntö ja osa kuvasta: Aumailley ym. 2005).

Eri laminiini-isoformien merkittävimmät erot ovat havaittavissa niiden lyhyissä sakaroissa (kuva 2.). Lyhyiden sakaroiden aminohappoketjut osoittavat huomattavaa sekvenssihomologiaa, mutta eroavat toisistaan ketjujen pituudessa ja domeenien lukumäärässä (Colognato ja Yurchenco 2000). $\alpha 3A$ -, $\alpha 4$ -, $\beta 3$ - ja $\gamma 2$ -ketjujen lyhyet sakarat ovat typistettyjä, kun taas $\alpha 5$ -laminiinin lyhyt sakara on hieman $\alpha 1$ -laminiinia pidempi.



Kuva 2: Laminiini-ketjujen rakenne (kuva Durbeej 2010 mukaillen)

3 LAMINIINIEN BIOSYNTESI, POLYMERISAATIO JA SITOUTUMINEN

Laminiinien kokoonpano α -, β -, ja γ -ketjuista tapahtuu karkeassa solulimakalvostossa kaksivaiheisesti: ensin β -, ja γ -ketjut sitoutuvat toisiinsa, minkä jälkeen α -ketju sitoutuu $\beta\gamma$ -dimeeriin (Peters ym. 1985; Lissitzky ym. 1988). $\alpha 2$ -, $\beta 1$ -, ja $\gamma 1$ -ketjujen fragmenteilla suoritettut kokeet osoittavat ketjujen liittymisen käynnistyvän LCC-domeenin noin 50 C-terminaalista aminohappoa käsittävältä alueella, josta yhteenliittyminen jatkaa N-terminaaliseen suuntaan (Nomizu ym. 1994). Tällä alueella sijaitsevat varautuneet aminohapot ovat avainasemassa sekä $\beta\gamma$ -dimeerin että $\alpha\beta\gamma$ -trimeerin muodostumisessa (Utani ym. 1994). Myös $\alpha 2$ - ja $\gamma 1$ -ketjujen isoleusiinitähteet ovat välttämättömiä vakaan trimeerirakenteen säilyttämiselle (Nomizu ym. 1994). Laminiinien synteesinopeus on riippuvainen α -ketjun ekspressiosta, sillä solut tuottavat β -, ja γ -laminiineja ylenmäärin (Peters ym. 1985; Lissitzky ym. 1988). Laminiiniketjut läpikäyvät ensimmäisen glykosylaation karkeassa solulimakalvostossa heti niiden synteesin jälkeen. Laminiinitrimeerit kuljetetaan lopullista oligosakkaridien muokkausta varten Golgin laitteeseen, josta molekyyli siirtyy solukalvolle eritettäväksi. Solut erittävät ainoastaan laminiinitrimeerejä, sillä yksittäiset laminiini-ketjut tai $\beta\gamma$ -dimeerit eivät poistu karkeasta solulimakalvostosta.

Merkittävimpiä laminiineja sisältäviä rakenteita ovat tyvikalvot (Miner 2008). Tyvikalvojen rakentuminen komponenteistaan on suurelta osin massavaikutuksen ajama, spontaani reaktio, jossa päärakennneosat, laminiini ja tyypin IV kollageeni polymerisoituvat itsenäisiksi molekyyliveroiksi. Glykoproteiini, nidogeeni yhdistää verkot toisiinsa luoden perusrakenteen, johon muut tyvikalvojen molekyylit sitoutuvat (Aumailley ym. 1993). Laminiinit muodostavat polymeerejä LN-domeenien välisten interaktioiden kautta (kuva 1.) (Yurchenco ym. 1985; Schittny ja Yurchenco 1990). *In vitro* polymerisaatio edellyttää täysimittaisten lyhyiden sakaroiden olemassaoloa jokaisessa ketjussa (Cheng ym. 1997). Typistettyjä lyhyitä sakaroita sisältävät laminiini-332 (kuva 2, kaikki lyhyet sakarat lyhennetty) ja -311 (α -ketjun lyhyt sakara lyhennetty) eivät kykene muodostamaan polymeerejä.

Nidogeeni-1 ja -2 liittävät laminiinipolymeerit tyypin IV kollageeni-verkkoon sitoutumalla laminiinin γ 1LEb3-domeeniin tai γ 3LEb2-4-domeeneihin (kuva 1.) (Fox ym. 1991; Mayer ym. 1993; Gersdorff ym. 2005). Nidogeeni-1 sitoutuu lisäksi γ 2L4-LEb1-domeeneihin (Sasaki ym. 2001). Laminiini-111 sitoutuu LN- ja LG4-5-domeenien kautta kollageeniin myös suoraan, mutta näiden sidosten merkitys laminiinin ja kollageeniin yhdistäjänä on nidogeeni-siltaa merkittävästi vähäisempi (Terranova ym. 1983; Charonis ym. 1986).

Laminiiniverkkoon sitoutuu nidogeenin lisäksi lukuisia muita solunulkoisia proteiineja, jotka mm. muokkaavat tyvikalvon rakennetta, ankkuroivat tyvikalvon solukalvoon, tukevat laminiinin polymerisaatiota ja yhdistävät laminiinimolekyylit solukalvon reseptoreihin (Yurchenco ym. 2004). Eri molekyylien ja laminiinin sitoutuminen toisiinsa vaihtelee laminiinin alayksikkökoostumuksen mukaan. Kaikkien tunnettujen sitoutumisinteraktioiden läpikäyminen tässä ei ole tarkoituksenmukaista, joten pyrin kuvaamaan ne lyhyesti (sitoutumiskohdat laminiini-111:ssä: kuva 1.).

Useat molekyylit, kuten hepariini, perlekaani, fibuliini-1 ja sulfatidit, sitoutuvat α 1LG4-5-domeeneihin (Kuva 1.) (Ott ym. 1982; Battaglia ym. 1992; Pan ym. 1993; Sasaki ym. 1998; Talts ym. 1999). Fibuliini-2 sitoutuu α 1L4a-domeeniin ja agriini laminiini-111:n LCC-domeenin keskelle (Utani ym. 1997; Denzer ym. 1998). Hepariini ja sulfatidit sitoutuvat kaikkien α -laminiiniketjujen LG1-5- ja LN-domeeneihin (Colognato-Pyke ym. 1995; Colognato ym. 1997; Talts ym. 1999, 2000; Nielsen ym. 2000; Timpl ym. 2000; Nielsen ja Yamada 2001; Utani ym. 2001; Garbe ym. 2002; Yu ja Talts 2003; Kariya ym. 2004). Fibuliini-1 ja -2 sitoutuvat α 2-, α 4- ja γ 2-ketjuihin ja nidogeeni-2 γ -laminiinien lisäksi α 2-ketjun LG-domeeneihin (Talts ym. 1999, 2000; Sasaki ym. 2001).

Tyvikalvon muodostuminen ja kiinnittyminen solukalvoon sekä useat solujen prosessit, kuten migraatio, erilaistuminen ja kasvu, ovat riippuvaisia laminiinien ja solujen yhteisvaikutuksesta (Suzuki ym. 2005). Tämä tapahtuu solukalvon laminiinireseptorien kuten integriinien, dystroglykaanin, syndekaanien ja Lutherin veriryhmän glykoproteiinin välityksellä.

Integriinit ovat suurin laminiinireseptorijoukko. Ne muodostuvat α - ja β -ketjuista. Useimmat integriinit tunnistavat monia solunulkoisia matriksiproteiineja ja matriksiproteiinit, kuten fibronektiini, laminiinit, kollageenit ja vitronektiini puolestaan sitoutuvat useisiin eri integriineihin (Giancotti ja Ruoslahti 1999). Laminiineja sitovia integriinejä tunnetaan ainakin yhdeksän: $\alpha 1\beta 1$ -, $\alpha 2\beta 1$ -, $\alpha 3\beta 1$ -, $\alpha 6\beta 1$ -, $\alpha 6\beta 4$ -, $\alpha 7\beta 1$ -, $\alpha 9\beta 1$ -, $\alpha V\beta 3$ - ja $\alpha V\beta 5$ -integriini (Forsberg ym. 1994; Colognato ym. 1997; Sasaki ja Timpl 2001; Nishiuchi ym. 2006). Näistä $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ ja $\alpha 7\beta 1$ sitovat ainoastaan laminiineja (Humphries ym. 2006). Integriinien sitoutumiskohdat sijaitsevat laminiinien LG1-3-domeeneissa sekä αLN - ja $\alpha 5L4b$ -domeenissa (Nomizu ym. 1995; Colognato ym. 1997; Hirosaki ym. 2000; Talts ym. 2000; Nielsen ja Yamada 2001; Sasaki ja Timpl 2001; Smirnov ym. 2002; Ido ym. 2004; Kariya ym. 2004). $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\gamma 1$ - ja $\gamma 2$ -ketjut eivät osallistu integriineihin sitoutumiseen suoraan mutta vaikuttavat sitoutumiseen todennäköisesti stabiloimalla LG1-3-domeenien aktiivista konformaatiota (Ido ym. 2007; Taniguchi ym. 2009). $\gamma 3$ -ketjun sisältävät laminiinit eivät sitoudu integriineihin sillä $\gamma 3$:n C-terminuksesta puuttuu $\gamma 1$ - ja $\gamma 2$ -ketjuissa konservoitunut, sitoutumiselle välttämätön glutamiinihappotähde (Ido ym. 2008). Sitouduttuaan ligandiinsa integriinit muuttavat solujen toimintaa aktivoimalla fokaalisia adheesiokinaaseja, pieniä Rho GTPaaseja tai MAPK-signaalointireitin ja säätelevät mm. solujen liikkuvuutta, selviytymistä ja proliferaatiota (Suzuki ym. 2005; Tzu ja Marinkovich 2008).

α -dystroglykaani on voimakkaasti glykosyloitu solunulkoinen proteiini ja osa dystrofiini-glykoproteiinikompleksia (Suzuki ym. 2005). Laminiinit sitoutuvat α -dystroglykaanin sokeriketjuihin. Sitoutumiseen osallistuvat $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 4$ - ja $\alpha 5$ -laminiinien LG4-5-domeenit sekä $\alpha 2$ - ja $\alpha 4$ -laminiinien LG1-3-domeenit (Talts ym. 1999, 2000; Ido ym. 2004). $\alpha 1$ - ja $\alpha 2$ -laminiinien affiniteetti α -dystroglykaanin on voimakas mutta $\alpha 4$ - ja $\alpha 5$ -laminiinien heikko. α -dystroglykaani sitoutuu solukalvon läpäisevään β -dystroglykaaniin, joka puolestaan sitoutuu sytoplasman dystrofiiniin (Henry ja Campbell 1999). Dystrofiini ankkuroi kompleksin solun aktiinitukirankaan. Dystroglykaani avustaa tyvikalvojen muodostumisessa yhdessä muiden matriksimolekyyliä sitovien reseptorien kanssa.

Syndekaanit ovat solukalvon läpäiseviä heparaanisulfaattiproteoglykaaneja, jotka sitoutuvat ligandeihinsa heparaanisulfaattiketjujensa avulla (Suzuki ym. 2005). Syndekaani-perheeseen kuuluu neljä jäsentä, joista syndekaani-1, -2 ja -4 sitoutuvat laminiinien LG4-5-domeeneihin (Hoffman ym. 1998; Utani ym. 2001). Lopuksi, Lutherin veriryhmän glykoproteiini on immunoglobuliinien suurperheeseen kuuluva reseptori, joka muista laminiinireseptoreista poiketen sitoo spesifisti α 5-laminiineja (Kikkawa ym. 2002).

4 LAMINIINIT KESKUSHERMOSTON KEHITYKSESSÄ

Ensimmäinen laminiinia sisältävä tyvikalvorakenne muodostuu jo ennen kuin alkio kiinnittyy kohdun limakalvoon ja laminiinit osallistuvat yksilönkehityksen aikana lukuisiin morfogeneettisiin ja organogeneettisiin tapahtumiin (Smyth ym. 1999; Miner ja Yurchenco 2004). Useimmissa kudoksissa laminiinit toimivat pääasiassa osana tiukasti järjestäytynyttä tyvikalvoa (Miner ja Yurchenco 2004). Keskushermostossa varsinaiset tyvikalvot rajoittuvat yleensä ottaen verisuonia ympäröivään ja koko keskushermostoa peittävän *pia materin* alla olevaan soluvälitilaan. Näiden rakenteiden ulkopuolisen soluväliaineen organisaatio tunnetaan huonosti, ja muutamissa tutkimuksissa laminiineja ei tyvikalvoja lukuunottamatta ole löydetty keskushermostosta lainkaan (Yamamoto ym. 1997; Villanova ym. 1997; Gersdorff ym. 2005). Tätä vastoin on olemassa useita raportteja lyhytaikaisesta tyvikalvojen ulkopuolisen laminiinin ekspressiosta (Liesi 1985a; Letourneau ym. 1988; Liesi ja Silver 1988; McLoon ym. 1988; Kafitz ja Greer 1997; Powell ym. 1998; Farwell ja Dubord-Tomasetti 1999; Libby ym. 2000; Colognato ym. 2002; Sharif ym. 2004). Hiirillä paikallinen laminiiniekspressio edeltää monia keskushermoston kehitysvaiheita ja häviää aikuisikään mennessä. Merkittävän poikkeuksen muodostavat hippokampuksen ja subependymaalisen alueen kantasoluvarastot, joissa neuronien tuotanto ja laminiinien ekspressio jatkuu läpi elämän (Indyk ym. 2003; Kerever ym. 2007; Shen ym. 2008). Tämänhetkisen tiedon mukaan laminiinit toimivatkin keskushermostossa rakenteellisten tehtävien sijaan lähes yksinomaan kehitystapahtumien säätelijöinä.

4.1 Hermostoputken sulkeutuminen

Keskushermosto saa alkunsa gastrulaatiossa syntyneen uloimman solukerroksen, ektodermin keskilinjjan soluista, jotka erilaistuvat selkäjänteen indusoivien signaalien vaikutuksesta hermoston kantasoluiksi ja muodostavat hermostolevyn (LaMantia 2004). Hermostoputki syntyy hermostolevystä sen lateraalisten osien taittuessa sisäänpäin ja yhdistyessä keskilinjassa. Ektodermin ja hermostolevyn basaalista pintaa verhoavat tyvikalvot, jotka sisältävät pääasissa $\alpha 1$ - ja $\alpha 5$ -lamiiniineja (Miner ym. 1998). *LAMA5*^{-/-}-hiirillä esiintyy yleisesti eksenkefaliaa, jonka aiheuttaa anteriorisen hermostoputken sulkeutumishäiriö. Mutanttihiirten ektodermin ja hermostolevyn tyvikalvot ovat normaaleja lukuunottamatta ektodermin hermostolevyn päiden vieressä olevaa aluetta, jossa tyvikalvo on poikkeuksellisesti ohut ja epätasainen. Ektodermin mediaalinen osa on keskeinen hermostoputken sulkeutumiselle välttämättömien voimien tuotannossa ja sen normaali funktio näyttäisi olevan riippuvainen tyvikalvokontaktista (Hackett ym. 1997). Myös lamiiniireseptorien puute $\alpha 3$ - sekä $\alpha 6$ -integriinin suhteen poistogeenisillä hiirillä aiheuttaa eriaisteisia hermostoputken sulkeutumishäiriöitä (De Arcangelis ym. 1999). *LAMA5*^{-/-}-hiiret osoittavat kompensatorista muiden α -lamiiniinialayksiköiden ekspressiota, mistä saattoi johtua tyvikalvokatkoksen muodostuminen ainoastaan korkealle mekaaniselle stressille alttiiseen ektodermin mediaaliseen osaan (Miner ym. 1998). Teoriaa heikentyneen tyvikalvon rasisurmurtumista johtuvasta hermostoputken sulkeutumishäiriöstä *LAMA5*^{-/-}-hiirillä tukee sulkeutumishäiriön sijainti ainoastaan kraniaalisella alueella, jossa hermostolevyn koko ja sen sulkeutuessa muodostuva kuormitus ovat korkeimmillaan.

4.2 Neurogeneesi ja migraatio

Hermostoputken kehityttyä alkeellisiksi aivoiksi ja selkäytimeksi käynnistyy keskushermoston lopullisten hermo- ja gliasolupopulaatioiden tuotanto (LaMantia 2004). Neuro- ja gliogeneesi alkaa hermostoputken luumenia ympäröivässä solukerroksessa (ventrikulaarinen alue, VZ), jossa hermoston kantasolut lisääntyvät ja erilaistuvat asteittain fenotyypiltään toinen toistaan rajatummiksi esiasteiksi ja lopulta postmitoottisiksi neuroneiksi, astrosyyteiksi ja oligodendrosyyteiksi (Götz ja Huttner 2005).

Ventrikulaarisen alueen solut ekspressoivat useita laminiinialayksikköjä ja laminiinireseptoreja kuten $\alpha 6$ -, $\alpha 7$ - ja $\beta 1$ -integriinejä sekä syndekaani-1:stä, mutta laminiinin rooli hermoston kantasolujen käyttäytymisen säätelyssä on yhä epäselvä (Lathia ym. 2007). *In vitro* laminiini parantaa hermoston kantasolujen ja neuronien esiasteiden proliferaatiota ja selviytymistä sekä nopeuttaa niiden erilaistumista (Flanagan ym. 2006; Hall ym. 2008; Ma ym. 2008). Laminiini ohjaa erilaistumista neuronaalisten fenotyyppien suuntaan ja saattaa lisäksi vaikuttaa muodostuneiden neuronien alatyyppeihin (Soen ym. 2006). Laminiinialustalla kasvatetussa hermosolujen esiasteviljelmässä GABAergisiä neuroneita syntyy glutamatergisten neuronien määrään suhteutettuna enemmän kuin toista yleistä soluväliaineen molekyylejä, fibronektiiniä sisältävällä alustalla (Goetz ym. 2006). Laminiinin vaikutus neuronien esiasteiden proliferaatioon ja selviytymiseen on ainakin osittain $\alpha 6$ - ja $\beta 1$ -integriinien välittämää (Hall ym. 2008; Ma ym. 2008).

Syntymänsä jälkeen neuronit siirtyvät tiukan säätelyn alaisina tarkkaan määritellyille kohdealueille (LaMantia 2004). Tapahtumaa kutsutaan migraatioksi ja sen tarkoitus on tuoda yhteen erilaisia neuroneita, jotta ne voisivat vuorovaikuttaa keskushermoston toiminnan kannalta tarkoituksenmukaisella tavalla. Migraatiotapoja on useita, ja niistä parhaiten tunnettuja ovat radiaalinen ja tangentialinen migraatio sekä ketjumigraatio (Franco ja Müller 2011). Tämä kirjallisuuskatsaus, kuten suurin osa laminiineja ja migraatiota käsitelleistä tutkimuksista, keskittyy laminiinien rooleihin iso- ja pikkuaivojen radiaalisessa migraatiossa. Radiaalinen, eli kudoksen säteen suuntainen

migraatio on solujen pääasiallinen migraatiotapa aivoalueilla, joilla neuronit organisoituvat rakenteellisesti ja toiminnallisesti erillisiin kerroksiin, kuten isoavokuorella, hippokampuksessa ja pikkuaivokuorella (LaMantia 2004). Radiaalista migraatiota ohjaavat erikoistuneet radiaaliset gliasolut (RGC), joiden haarakkeita pitkin solut vaeltavat. Isoaivoissa neuronit vaeltavat VZ:lta radiaalisesti aivokalvojen alla olevaan solukerrokseen (marginaalinen alue). Pikkuaivojen monilukuisimman solujoukon, jyväissolujen esiasteet syntyvät hermostoputken ja neljännen aivokammion kattolaatan kohtaamispisteessä ja vaeltavat tangentialisesti eli kudoksen pinnan suuntaisesti pikkuaivojen pinnalle muodostaen ulkoisen jyväissolukerroksen (Wingate 2001). Täällä esiasteet jakautuvat postmitoottisiksi jyväissoluiksi, jotka vaeltavat radiaalisesti sisäänpäin Purkinjen solukerroksen alla olevaan sisäiseen jyväissolukerrokseen.

VZ:n lisäksi laminiineja esiintyy pistemäisinä kertyminä vaeltavien neuronien yhteydessä ja tyvikalvoissa, jotka ympäröivät koko keskushermostoa sekä aivoverisuonia (Liesi 1985a; Lathia ym. 2007; Franco ja Müller 2011). Useat tutkimukset ovat osoittaneet tyvikalvojen ja laminiinin olevan välttämättömiä aivorakenteiden oikean kerrosrakenteen muodostumiselle eli laminaatiolle (Halfter ym. 2002; Chen ym. 2009; Loulier ym. 2009; Radakovits ym. 2009).

Pia materin alla oleva niin sanottu meningeaalinen tyvikalvo toimii RGC:en marginaalisten haarakkeiden kiinnittymispisteinä ja sen poistaminen joko kirurgisesti tai tuhoamalla tyvikalvon molekyylejä erittävät meningeaaliset solut kemiallisesti johtaa laminaatiovirheisiin pikkuaivoissa ja neokorteksilla (Sievers ym. 1994; Radakovits ym. 2009). Meningeaalisessa tyvikalvossa esiintyy $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ - ja $\gamma 1$ -laminiinialayksikköjä (Halfter ym. 2002; Blaess ym. 2004). Eri alayksikköjen tehtävien tutkimusta keskushermoston solumigraatioissa hankaloittaa laminiinin keskeinen rooli migraatiota edeltävissä kehitystapahtumissa. Useat eri laminiiniketjujen suhteen poistogeeniset sikiöt kuolevat ennen riittävän iän saavuttamista, mutta hiiret, joiden $\gamma 1$ -laminiinista puuttuu nidogeenia sitova $\gamma 1$ LEb3-domeeni, sekä *LAMA4*:n suhteen poistogeeniset, $\alpha 2$ -laminiinin puutetta aiheuttavaa *LAMA2^{dy}*-mutaatiota kantavat hiiret,

kärsivät kehityshäiriöistä, jotka muistuttavat meningeaalisen tyvikalvon tuhoamista seuraavia häiriöitä (Miner ym. 1998, 2004; Smyth ym. 1999; Halfter ym. 2002; Radakovits ym. 2009). γ 1LEb3-mutanttihiirten meningeaalinen tyvikalvo on rakenteeltaan katkonainen ja aivokalvon tyvikalvoa peittävä solukerros epätasainen (Halfter ym. 2002). Tyvikalvon katkosten kohdalla RGC:en basaaliset haarakkeet eivät yllä aivokalvojen alapintaan saakka, vaan sijaitsevat sattumanvaraisesti eri etäisyyksillä *pia materista*. Näillä alueilla ensimmäisiin syntyneisiin neuroneihin kuuluvat, radiaalisesti vaeltavat Cajal-Retzius (CR) -solut, jotka normaalisti valtaavat marginaalisen alueen, jakautuvat koko aivokuoren yläpuoliskoon ja aivokalvojen yläpuolelle tai puuttuvat kokonaan. Virheet CR-solukerroksessa toistuvat tarkasti alemmissa, myöhemmin syntyneissä neuronikerroksissa, sillä CR-solut säätelevät migraatiota erittämällä pysähdysmerkkinä toimivaa reelin-proteiinia: neuronit tunkeutuvat marginaaliselle alueelle siellä, mistä CR-solut puuttuvat, ja kertyvät kortikaalisen seinämään CR-soluektopioiden alle.

LAMA2^{dy/dy}/LAMA4^{-/-}-hiirten radiaaliset gliasolut, ovat γ 1LEb3-mutanttihiirten RGC:en tavoin irronneet meningeaalisesta tyvikalvosta (Radakovits ym. 2009). RGC:en tyvikalvoon kiinnittymisen on toistuvasti osoitettu olevan välttämätöntä aivokuoren laminaatiolle (Sievers ym. 1994; Costell ym. 1999; Graus-Porta ym. 2001; Halfter ym. 2002; Moore ym. 2002; Pöschl ym. 2004; Qu ja Smith 2005; Radakovits ym. 2009). Radakovits ja kumppanit (2009) osoittavat ensimmäistä kertaa myös RGC:en selviytymisen olevan tyvikalvokontaktista riippuvaista. *LAMA2^{dy/dy}/LAMA4^{-/-}*-hiirillä tämä näkyy apoptoottisten solujen määrän voimakkaana kasvuna ventrikulaarisella neuroepiteelillä. Neuronien migraatiota ohjaavan ominaisuutensa lisäksi RGC:t ovat yksi hermosolujen esiasteista: suurin osa aivojen neuroneista ovat RGC:en suoria tai epäsuoria jälkeläisiä (Götz ja Huttner 2005). *LAMA2^{dy/dy}/LAMA4^{-/-}*-hiirillä aivokuoren koko on merkittävästi tavanomaista pienempi, mikä johtuu luultavasti RGC:en apoptoosista seuranneesta neuronien määrän dramaattisesta laskusta (Radakovits ym. 2009). Pelkkä α 2- tai α 4-laminiinin puute ei vaikuta meningeaalisen tyvikalvon muodostumiseen eikä RGC:en kalvoon kiinnittymiseen hiirillä. Tästä huolimatta α 2-laminiinin puutteesta johtuvaa synnynnäistä lihasdystrofiaa sairastavilta henkilöiltä on

löydetty migraatiovirheiden aiheuttamia kortikaalisia dysplasioita kuten polymikrogyriaa ja agyriaa sekä hamartoomia (Sunada ym. 1995; Pini ym. 1996; Philpot ym. 1999).

Lisänäyttöä meningeaalisen tyvikalvon ja laminiinin merkityksestä aivorakenteiden laminaatiolle on löydettävissä laminiinireseptoreilla tehdyistä tutkimuksista. $\beta 1$ -integriinit ankkuroivat RGC:t meningeaalisen tyvikalvon laminiinirunkoon ja niiden puutteen aiheuttamat kehityshäiriöt vastaavat tyvikalvon vaurioista seuraavia häiriöitä (Radakovits ym. 2009). Keskushermoston $\beta 1$ -integriinin suhteen poistogeenisten hiirten isoaiukuori ja pikkuaivot ovat tavanomaista pienemmät ja pikkuaivojen poimut sekä aivopuoliskot ovat sulautuneet osittain yhteen (Graus-Porta ym. 2001). Mutanttihiirten RGC:t eivät kiinnity meningeaaliseen tyvikalvoon ja niiden apoptoosi on lisääntynyt voimakkaasti (Radakovits ym. 2009). Isoaiukuoren CR-solukerros ja ylimmät kortikaaliset kerrokset ovat epämuodostuneita ja, vaikka mutanttihiirten pikkuaivoihin muodostuukin alkeellinen sisäinen jyväissolukerros, suuri määrä jyväissoluja jää pikkuaivojen pinnalle ja alueille, joilla pikkuaivopoimut ovat sulautuneet yhteen. Mutanttihiirten meningeaalinen tyvikalvo on katkonainen, mikä viittaa siihen, että $\beta 1$ -integriinit ovat välttämättömiä meningeaalisen tyvikalvon muodostumiselle tai sen aiukuoren kehityksen aikana tapahtuvalle uudistumiselle (Graus-Porta ym. 2001). $\beta 1$ -integriinin kanssa dimerisoituvan $\alpha 3$ - tai $\alpha 6$ -integriinin suhteen poistogeeniset hiiret kärsivät samanlaisista migraatiohäiriöistä aiukuorella kuin keskushermoston $\beta 1$ -integriinin suhteen poistogeeniset hiiret (Georges-Labouesse ym. 1998; Anton ym. 1999).

Iso- ja pikkuaivukuoren neuronien migraatiovirheitä on nähtävissä myös dystroglykaanin suhteen poistogeenisillä hiirillä ja hiirillä, jotka kantavat mutaatioita α -dystroglykaanin glykosyloivassa N-asetyyli-glukosamiini glykosyylitransferaasissa (Michele ym 2002; Moore ym. 2002; Qu ja Smith 2005). Hypoglykosyloitunut α -dystroglykaani sitoutuu laminiiniin erittäin huonosti ja näyttäisi olevan useiden synnynnäisten lihasdystrofioiden taustalla (Michele ym. 2002). Lihasdystrofian lisäksi taudinkuvaltaan toisiaan vahvasti muistuttavat lihas-silmä-aivosairaus, Fukuyaman

synnynnäinen lihasdystrofia ja Walker-Warburg syndrooma aiheuttavat tyypin II lissenkefaliaa, jolle tyypillistä ovat migraatiovirheet iso- ja pikkuaivoissa sekä virheet aivopoimujen muodostumisessa (Haltia ym. 1997; Kobayashi ym. 1998; Yoshida ym. 2001; Beltrán-Valero de Bernabé ym. 2002; Michele ym. 2002; van Reeuwijk ym. 2005). Näiden sairauksien kantajilta on löydetty mutaatioita useista α -dystroglykaanin glykosylaatioon osallistuvista entsyymeissä. Migraatiovirheiden toiminnallinen merkitys Walker-Warburg syndroomassa on tuntematon sillä potilaiden eliniän odote on alle vuosi (Beltrán-Valero de Bernabé ym. 2002). Lihas-silmä-aivosairaus ja Fukuyaman synnynnäinen lihasdystrofia johtavat älylliseen kehitysvammaisuuteen (Kobayashi ym. 1998; Yoshida 2001).

Laminiinien rooli neuronien radiaalisessa migraatiossa ei rajoitu niiden tehtäviin osana meningeaalista tyvikalvoa. Iso- ja pikkuaivokuoren kehittyessä laminiini esiintyy pistemäisinä kertyminä RGC:en ja Bergmannin gliasolujen ympärillä ja γ 1-laminiinin neuriittien kasvua parantavan domeenin (ketjun C-terminaaliosassa) päästä [Barlow ym. 1984; Liesi ym. 1989]) tunnistavat vasta-aineet estävät migraatiota *in vitro* (Liesi 1985a; Liesi ym. 1992). Chen ym. (2009) tutkivat kortikaalisten neuronien migraatiota ja morfologiaa hiirillä, joiden neuroneista osa ei tuottanut γ 1-laminiinia. Hiirten meningeaalinen tyvikalvo on ehjä ja radiaaliset gliasolut näyttävät normaaleilta, mutta neuronien vaellus pysähtyy liian varhain ja aivokuoren kerrokset epämuodostuvat. Neuronit eivät tavanomaisesta poiketen kasvata pitkiä dendrittejä kohti aivokuoren pintaa ja primaarissa neuroniviljelmässä γ 1-laminiinin puute estää merkittävästi neuriittien kasvua.

VZ:n laminiinit sisältävät α 2-, α 4-, β 2- ja todennäköisesti monia muitakin laminiiniketjuja mutta ne eivät sisällä muuten kaikkialla läsnäolevaa α 1-laminiinia (Lathia ym. 2007). Radiaaliset gliasolut ekspressoivat useita laminiinireseptoreja ja erityisesti α 6- ja β 1-integriinejä on löydettävissä suurina määrinä VZ:lta. Integriinivälitteisten vaikutusten arviointia poistogeenisten hiirten RGC:en apikaalisissa haarakkeissa hankaloittaa integriinien migraatiolle keskeinen rooli niiden basaalisissa haarakkeissa (Graus-Porta ym. 2001). Hiirten lateraaliseen aivokammioon injisoitu β 1-

integroinivasta-aine estää tilapäisesti $\beta 1$ -integroinien ja niiden ligandien vuorovaikutukset vain ventrikulaarisella ja subventrikulaarisella alueella (SVZ) ja on mahdollistanut RGC:en apikaalisten haarakkeiden $\beta 1$ -integroinivälitteisten tehtävien arvioinnin (Loulier ym. 2009). Vasta-ainekäsittely sekoittaa RGC:en interkineettisen ydinmigraation, muuttaa solujen jakautumistason kulmaa ja johtaa apikaalisten haarakkeiden irtoamiseen aivokammion pinnalta. Osa RGC:en basaalisista haarakkeista on surkastuneita ja somatosensorisen aivokuoren kerrokset I-V ovat epätavallisen ohuita ja kapeita. Samanlaisia poikkeavuuksia on nähtävissä $\alpha 2$ -laminiinin suhteen poistogeenisillä hiirillä, joten $\alpha 2$ -laminiinit näyttäisivät olevan tärkeä ligandi VZ:n integroiineille.

Hyvin erikoistunut mutta maininnan arvoinen migraatioprosessi, jota laminiinit säätelevät, on neuroblastien syntymän jälkeinen ketjumigraatio SVZ:lta hajukäämiin. Soluketjujen muodostuminen ja normaali migraatio ovat riippuvaisia migraatioreittiä verhoavien $\alpha 2$ - ja $\alpha 4$ -laminiinien sekä vaeltavien neuroblastien solukalvon $\beta 1$ -integroinien välisistä vuorovaikutuksista (Belvindrah ym. 2007b).

Tämänhetkisen tutkimustiedon mukaan laminiinit osallistuvat iso- ja pikkuaivokuoren neuronien migraatioon (1) isoaivojen VZ:lla, (2) vaeltavissa neuroneissa ja (3) meningeaalisessa tyvikalvossa. Meningeaalisen tyvikalvon tarkka laminiini-isoformikoostumus ja eri isoformien täyttämät tehtävät ovat yhä tuntemattomia. Koska $\alpha 2$ - tai $\alpha 4$ -laminiinin puuttuminen hiirillä ei vaikuta tyvikalvon muodostumiseen eikä toimintaan, on kuitenkin selvää, että osa tehtävistä on jaettu useille isoformeille (Radakovits ym. 2009). $\alpha 2$ -laminiinin puutteesta johtuvaa synnynnäistä lihasdystrofiaa sairastavilla henkilöillä esiintyvät migraatiovirheet saattavat heijastaa meningeaalisen tyvikalvon ulkopuolisen $\alpha 2$ -laminiinin tärkeyttä neuronien migraatiolle tai lajikohtaisia eroja meningeaalisen tyvikalvon koostumuksessa.

Meningeaalisen tyvikalvon laminiini ei luultavasti aktiivisesti osallistu neuronien migraatioon, vaan toimii tyvikalvon rakennuspalikkana ja migraatiota ohjaavien radiaalisten gliasolujen basaalisten haarakkeiden kiinnittymispisteinä. RGC:en irtoaminen tyvikalvosta aiheuttaa migraatiovirheitä irtoamisen taustalla olevasta syystä

riippumatta. Syynä voi olla RGC:en laminiinireseptorien puutteesta tai niiden translaation jälkeisen muokkauksen ongelmista johtuva RGC:en kyvyttömyys kiinnittyä tyvikalvoon (Graus-Porta ym. 2001; Moore ym. 2002; Qu ja Smith 2005; Radakovits ym. 2009). Syynä voi olla myös laminiinien tai muiden tyvikalvon molekyyliden puutteesta tai sitoutumisongelmista johtuva tyvikalvon hajoaminen (Costell ym. 1999; Halfter ym. 2002; Pöschl ym. 2004; Radakovits ym. 2009). Lopputulos migraation kannalta on sama: irronneet RGC:t vetäytyvät aivokuoren pinnasta ja neuronien migraatio etenee hallitsemattomasti. Vaikka meningeaalinen tyvikalvo ei suoraan säätele migraatiota, toimii se kuitenkin keskushermoston ja sen ulkopuolisen kudoksen erottavana rajana vaeltaville neuroneille. Ilman tyvikalvoa neuronit saattavat vaeltaa *pia materin* pinnan ohi ja asettua aivojen ulkopuolelle (Halfter ym. 2002).

Meningeaalisesta tyvikalvosta irronneet radiaaliset gliasolut käynnistävät pian irtoamisen jälkeen apoptoosin (Radakovits ym. 2009). Laminiineilla ei ole osoitettu olevan suoraa vaikutusta RGC:en proliferaatioon tai selviytymiseen ja niiden rooli on luultavasti lähinnä avustava: laminiini pitää RGC:en haarakkeet lähellä aivokalvoista peräisin olevia kosketusvälitteisiä tai diffundoituvia signaaleja. Aivokalvojen solujen tiedetään säätelevän neuronien proliferaatiota ja selviytymistä, mutta vaikutuksen aikaansaavat molekyylit ja niitä erittävät solutyypit ovat yhä tuntemattomia (Gensburger ym. 1986). Blaess ym. (2004) ovat osoittaneet laminiini-111–Sonic hedgehog -kompleksin sitoutuvan $\beta 1$ -integrineihin ja tehostavan pikkuaivojen jyväissolujen esiasteiden proliferaatiota. Ehkä laminiinin ja Sonic hedgehogin muodostama kompleksi vaikuttaa myös radiaalisiin gliasoluihin.

Meningeaalisen tyvikalvon ulkopuolisen laminiinin tehtävistä keskushermoston migraatiossa tiedetään melko vähän. Neuronit, jotka eivät tuota $\gamma 1$ -laminiinia, keskeyttävät vaelluksensa liian varhain (Chen ym. 2009). Koska nämä neuronit eivät tavanomaisesta poiketen kasvata tunnustelevia haarakkeita, arvelivat tutkimuksen tekijät, että vaeltavien neuronien tuottama laminiini asettuu neuronien ja niiden haarakkeiden sekä RGC:en ympärille ja toimii välikappaleena neuronin-glia vuorovaikutuksissa sekä tehostaa neuronin *piaa* kohti ohjaavan haarakkeen kasvua.

Gliasolujen laminiinireseptori on mahdollisesti jokin $\beta 1$ -integriineistä, sillä keskushermoston $\beta 1$ -integriinien suhteen poistogeenisten hiirten aivokuoren neuronit eivät $\gamma 1$ -laminiinia ekspressoimattomien neuronien tapaan kasvata pitkiä dendrittejä ja dendriittien kasvusuunta on sattumanvarainen (Belvindrah ym. 2007a). Aivokuoren neuronien ja gliasolujen sekaviljelmässä gliasolujen $\beta 1$ -integriinit ovat välttämättömiä neuronien neuriittien kasvuille mutta neuronien $\beta 1$ -integriinit eivät. Lisäksi fosforyloituneiden integriinivasteenvälittäjien, FAK:n, paksilliinin, AKT:n ja GSK-3 β :n määrät ovat vähentyneet aivokuorella, jonka neuroneista osa ei tuota $\gamma 1$ -laminiinia (Chen ym. 2009).

VZ:n laminiinit näyttäisivät meningeaalisen tyvikalvon laminiinien tapaan toimivan ankkureina, jotka ylläpitävät RGC:en neuronien migraatiota ohjaavaa kaksinapaista morfologiaa. Erikoista kyllä nämä laminiinit eivät ole järjestäytyneet tyvikalvorakenteeksi (Loulier ym. 2009). RGC:en apikaalisen haarakkeen laminiini/integriinivuorovaikutuksen estäminen johtaa haarakkeen irtoamiseen, basaalisen haarakkeen surkastumiseen ja häiriöihin neuronien migraatiossa. Kiinnittyminen aivokammion pinnalle näyttäisi olevan tärkeää myös RGC:en jakautumiskäyttäytymisen säätelylle. Radiaalisten gliasolujen apikaalisten haarakkeiden $\beta 1$ -integriinireseptorien toiminnan estäminen muuttaa niiden jakautumistason kulmaa ja interkineettistä ydinmigraatiota. Häiriöt mitoosisukkulun toimintaa säätelevissä molekyyleissä vaikuttavat muodostuvien neuronien esiasteiden määrään, muuttavat interkineettistä ydinmigraatiota ja näkyvät isoavokuoren pienentymisenä (Feng ja Walsh 2004; Xie ym. 2007). Ventrikulaarisen $\beta 1$ -integriinisignaloinnin estämisestä seuraava kortikaalisten kerrosten ohuus saattaa näin ollen olla seuraus vähentyneestä neurogeneesistä.

4.3 Aksonien kasvu

Neuronien saavutettua lopulliset sijaintinsa ne yhdistyvät aksonien ja synapsien välityksellä hermoverkoiksi, jotka lopulta ohjaavat yksilön toimintaa (LaMantia 2004). Suuri osa tiedosta liittyen laminiinin osallisuuteen aksonien kasvussa on peräisin *in vitro* tutkimuksista. Laminiinin lisääminen neuronien kasvualustalle tehostaa neuriittien

eli aksonien ja dendriittien esiasteiden kasvua (Manthorpe ym. 1983; Liesi ym. 1984a ja 2001a; Kafitz ja Greer 1997). Paikallisesti kasvualustalla esiintyvä laminiini osallistuu aksonin spesifiointiin indusoimalla siihen koskevan neuriitin ja inhiboimalla palautevaikutusmekanismien kautta solun muiden neuriittien kasvua (Esch ym. 1999; Ménager ym. 2004). Lisäksi laminiini vaikuttaa aksonien kasvusuuntaan (Gomez ja Letourneau 1994; Kuhn ym. 1995).

Pistemäisiä laminiinikertymiä esiintyy kasvavien aksonien yhteydessä useilla aivoalueilla (Letourneau ym. 1988; Liesi ja Silver 1988; McLoon ym. 1988; Kafitz ja Greer 1997). Laminiinin ekspressio alueilla edeltää aksonien kasvua ja päättyy pian aksonien ohitettua alueen tai saavutettua kohteensa. Suora näyttö siitä, että laminiini ohjaa keskushermoston aksonien kasvua *in vivo*, rajoittuu kuitenkin pariin tutkimukseen (García-Alonso ym. 1996; Höpker ym. 1999; Chen ym. 2009).

Banaanikärpäsien pistesilmien pioneeriaksonit kasvavat kohti aivoja solunulkoisen matriksen verhoamassa urassa ja pohjustavat tien myöhemmin kasvaville pistesilmähermoille (García-Alonso ym. 1996). Osittaiset toiminnanmenetysmutaatiot kärpästen *LAMA*-geenissä (banaanikärpäsien ainoa tunnettu α -laminiinigeeni) aiheuttavat erilaisia pioneeriaksonien suunnistusvirheitä. Myös verkkosilmien fotoreseptoriaksonien kasvu mutanttikärpäsillä on häiriintynyt.

Laminiini-111 moduloi kynsisammakon retinan neuronien kasvukartion käyttäytymistä näköhermon päässä muuttamalla niiden netriini-1-vasteen attraktiosta repulsioon (Höpker ym. 1999). β 1-laminiinin YIGSR-fragmentin injisointi retinan pinnalle aikana, jolloin aksonit matkaavat sitä pitkin kohti näköhermonpäättä, aiheuttaa aksonien suunnistusvirheitä ja näköhermokimpun muodostuminen epäonnistuu. Netriini-1:stä esiintyy koko näköhermonpään alueella mutta laminiini-111:n ekspressio on rajoittunut näköhermokanavan sisäänkäynnin yhteyteen kohtaan, jossa kasvukartiot kääntynyt poistuaan retinasta. Näin ollen laminiini luultavasti ohjaa retinan aksonit näköhermokanavaan muuttamalla paikallisesti niiden vasteen netriini-1:lle.

γ 1-laminiinin puute hiirillä johtaa aiemmin mainittujen migraatiohäiriöiden lisäksi epänormaalien haarakkeiden kasvuun aivokurkiaisesta aivojen pintaa kohti (Chen ym. 2009). Myös integriinireseptorien vasteenvälittäjien Akt:n ja GSK-3 β :n fosforyloitumisen hiirillä havaittiin vähentyneen. Yksi GSK-3 β :n kohdemolekyyleistä on mikrotubulusdynamiikkaa säätelevä CRMP-2 (Yoshimura ym. 2005). *In vitro* fosforyloitumaton, aktiivinen GSK-3 β fosforyloi ja inaktivoi CRMP-2:n, jolloin CRMP-2:n kyky sitoutua tubuliiniin heikkenee ja aksonin kasvu pysähtyy.

4.4 Myelinaatio

Aksonin eristäminen myeliinillä nopeuttaa hermoimpulssien ja tiedon kulkua hermostossa. Myelinaatio on tärkeää myös normaalille aksoninsisäiselle kuljetukselle sekä neuronien elinkyvylle ja myeliinin tuhoutuminen aiheuttaa vakavia neurologisia oireita (Bradl ja Lassmann 2010; Mehanna ja Jankovic 2013). Keskushermoston aksonien myelinaatiosta vastaavat oligodendrosyytit. Oligodendrosyyttien esiasteet syntyvät pääasiassa selkäytimen ventraalisella VZ:lla ja isoajojen ganglionisissa eminensseissä, josta ne vaeltavat huomattavia matkoja ja läpikäyvät monimutkaisen erilaistumisohjelman ennen myelinaatiota (Bradl ja Lassmann 2010).

Tyvikalvo ympäröi normaaleja myelinoivia Schwannin soluja ja laminiinin rooli ääreishermoston myelinaatiossa on hyvin tunnettu (Podratz ym. 2001; Colognato ym. 2005; Yang ym. 2005). Schwannin soluista poiketen oligodendrosyytit myelinoivat yhden sijaan useita aksoneita ja niillä ei ole myelinaatiota ohjaavaa tyvikalvoa apunaan (Colognato ym. 2005). Näin ollen laminiinista ääreishermoston myelinaatiota tutkimalla opitut asiat eivät ole suoraan sovellettavissa keskusteltaessa niiden osallisuudesta keskushermoston myeliinitupprien muodostumisessa. Varsinaisten tyvikalvojen puutteesta huolimatta laminiinia esiintyy useiden aivoalueiden aksonireittien varrella aikana, jolloin aksonien myelinaatio käynnistyy (Powell ym. 1998; Farwell ja Dubord-Tomasetti 1999; Colognato ym. 2002). Lisäksi oligodendrosyytit ekspressoivat laminiinireseptoreja, α 6 β 1-integriiniä ja dystroglykaania (Relvas ym. 2001; Colognato ym. 2002 ja 2007).

$\alpha 2$ -lamiiniin puutteesta johtuvaa synnynnäistä lihasdystrofiaa sairastavilla henkilöillä esiintyy eriasteisia valkean aineen poikkeavuuksia (Sunada ym. 1995; Caro ym. 1999; Philpot ym. 1999; Gilhuis ym. 2002). *LAMA2*^{-/-}-hiirten ja $\alpha 2$ -lamiiniin puutetta aiheuttavaa *LAMA2*^{dy}-mutaatiota kantavien *dy/dy*-hiirten aivokurkiaisien aksoneista merkittävä osa on dysmyelinoituneita ja ilman myeliinituppea olevia aksoneja on huomattavasti enemmän kuin villityypin hiirillä (Chun ym. 2003; Relucio ym. 2009 ja 2012). Lamiiniini-211 lisää voimakkaasti oligodendrosyyttien myeliinikalvon muodostumista *in vitro*, ja osa $\alpha 2$ -lamiiniin puutteen aiheuttamista myelinaatiovirheistä johtuu luultavasti häiriöistä myeliinitupen muodostumisessa (Buttery ja French-Constant 1999; Relvas ym. 2001; Chun ym. 2003). Lamiiniini-211 säätelee myös oligodendrogeneesiä ja epänormaali oligodendrosyyttien kehitys epäilemättä myötävaikuttaa havaittujen myelinaatiovirheiden muodostumiseen.

Neurogeneesin aikaan alkanut VZ/SVZ:n lamiiniiniekspressio jatkuu läpi oligodendrogeneesin (Lathia ym. 2007; Relucio ym. 2012). Oligodendrosyyttien esiasteiden (OPC) määrä perinataalisilla *LAMA2*^{-/-}-hiirillä on tavanomaista vähäisempi sekä niiden syntymäpaikalla, dorsaalisella VZ/SVZ:lla että viereisessä kehittyvässä valkean aineen aksonikeskittymässä, aivokurkiaisessa (Relucio ym. 2012). *LAMA2*^{-/-}-hiirten OPC:iden syntymänopeus, proliferaatio ja migraatiokäyttäytyminen ovat normaaleja mutta solukuolema kiihtynyttä.

Ero *LAMA2*^{-/-}- ja villityypin hiirten aivokurkiaisien OPC:iden määrissä tasoittuu hiirten toisella elinviikolla ja kolme viikkoa syntymän jälkeen *LAMA2*^{-/-}-hiirten OPC:iden määrä aivokurkiaisessa on yllättäen huomattavasti villityypin hiiriä korkeampi (Relucio ym. 2012). Tästä huolimatta *LAMA2*^{-/-}-hiirten kypsien oligodendrosyyttien määrä on koko aivokurkiaisien aksonien myelinaation ajan alhaisempi kuin villityypin hiirillä, mikä yhdessä myeliinitupen muodostumishäiriöiden kanssa selittää havaitut puutteet myelinaatiossa. Kypsien oligodendrosyyttien vähäinen määrä johtuu ongelmista erilaistumisessa, sillä niiden solukuolema ei ole kiihtynyttä.

LAMA2^{-/-}- ja osittain *dy/dy*-hiirillä suoritettujen koesarjojen tulosten perusteella $\alpha 2$ -ketjun sisältävät lamiiniinit ovat tärkeitä (1) VZ/SVZ:n ja aivokurkiaisien OPC:iden

selviytymisen tukemisessa, (2) oligodendrosyyttien erilaistumisen säätelyssä ja (3) myeliinikalvon muodostumisessa (Chun ym. 2003; Relucio ym. 2009 ja 2012). Mahdollinen mekanismi, jolla laminiini säätelee näinkin erilaisia tehtäviä, tulee verihäntäkasvutekijällä (PDGF) ja neureguliini-1:llä (NRG-1) tehdyistä tutkimuksista.

Oligodendrosyyttien kehityksen varhaisvaiheessa PDGF ja NRG-1 toimivat mitogeeneinä estäen oligodendrosyyttien erilaistumista ja myeliinikalvon muodostumista (Canoll ym. 1996; Calver ym. 1998; Colognato ym. 2002). Laminiini-211:n sitoutuessa oligodendrosyyttien $\alpha 6 \beta 1$ -integriinin vaihtuu NRG-1:n aktivoima signaalikaskadi fosfoinositidi-3-kinaasireitistä MAP-kinaasireittiin (Colognato ym. 2002). Molempien kinaasien aktivoimat signaalintireitit tukevat oligodendrosyyttien selviytymistä mutta MAP-kinaasisignointi ei estä oligodendrosyyttien erilaistumista.

PDGF aktivoi fosfoinositidi-3-kinaasireitin laminiinin läsnäolosta riippumatta (Colognato ym. 2002). Mahdollisesti eri signaalintireiteistä johtuen PDGF:n ja NRG-1:n vaikutus oligodendrosyyttien selviytymiselle laminiini-211:n läsnäollessa on additiivinen. Laminiini vähentää oligodendrosyyttien selviytymiseen tarvittavaa PDGF:n pitoisuutta ja, koska kudossiirännäiskokeissa PDGF-pitoisuuden on todettu rajoittavan näköhermon oligodendrosyyttien selviytymistä, toimii mahdollisesti selviytymissignaalinnin kohdentajana aksonien läheisyydessä oleville oligodendrosyyteille (Frost ym. 1999; Colognato ym. 2002; Barres ym. 1992)

Avainasemassa oligodendrosyyttien laminiinivasteiden välittäjänä on Src-perheen sytoplasmisiin tyrosiinikinaaseihin kuuluva Fyn. Fyn aktivoituu laminiinin sitoutuessa $\alpha 6 \beta 1$ -integriinin ja laminiini-211:n indusoima muutos oligodendrosyyttien PDGF- ja NRG-1-vasteessa on riippuvainen Fynin aktivaatiosta (Colognato ym. 2004). Fyn tukee myös myelinaatiota nopeuttamalla myeliinin synteesiä ja sitomalla myeliinikalvon laajentumiselle ja muovautumiselle tärkeitä solutukirangan proteiineja, α -tubuliinia ja Tau-proteiinia (Klein ym. 2002; Laursen ym. 2009). Toinen tärkeä myelinaatiota ohjaava signaalinvälittäjä on integriiniin liittyvä kinaasi, joka yhdistää integriinireseptorit solun aktiinitukirankaan ja on välttämätön laminiinin tehostamalle oligodendrosyyttien myeliinikalvon muodostumiselle (Chun ym. 2003; Legate ym.

2006). Laminiini tehostaa myeliinikalvon muodostumista myös sitoutumalla dystroglykaaniin, joka dystrofiini-glykoproteiini-kompleksin kautta yhdistää laminiinin solun tukirankaan (Henry ja Campbell 1999; Colognato ym. 2007).

Oligodendrosyyttejä muodostuu enemmän kuin normaalille myelinaatiolle on tarpeellista ja ainoastaan riittävän aksonikontaktin solmineet oligodendrosyytit selviytyvät (Barres ym. 1993; Trapp ym. 1997). Myelinoituvien aksonien yhteydessä sijaitseva laminiini-211 näyttäisi toimivan osana oligodendrosyyttien kohteesta riippuvaisista selviytymissignaalointia ja tarjoavan oligodendrosyyttien erilaistumista ja myeliinikalvon muodostumista tukevan ympäristön. Selviytymissignaaliteorian suurin ongelma on siinä, että vain kypsien oligodendrosyyttien selviytyminen *in vitro* on laminiini-211:stä riippuvaista (Frost ym. 1999; Colognato ym. 2002). *LAMA2*^{-/-} ja *dy/dy*-hiirillä OPC:iden selviytyminen on heikentynyt mutta kypsien oligodendrosyyttien ei (Relucio ym. 2009 ja 2012). On kuitenkin mahdollista, että toinen laminiini, esimerkiksi laminiini-411 pystyy korvaamaan osan laminiini-211:n tehtävistä *LAMA2*^{-/-} ja *dy/dy*-hiirillä. Laminiinit saattavat tukea OPC:iden selviytymistä epäsuorasti sitomalla jotain toistaiseksi tuntematonta selviytymistä tukevaa molekyyliä osallistumatta kuitenkaan sen signalointiin. Kandidaatti tämän molekyylin rooliin voisi olla Sonic hedgehog, jonka tiedetään tukevan OPC:iden selviytymistä SVZ:lla syntymän jälkeen ja voimistavan pikkuaivojen jyväissolujen proliferaatiota sitoutumalla laminiiniin (Machold ym. 2003; Blaess ym. 2004; Relucio ym. 2012).

4.5 Synaptogeneesi ja synaptinen plastisuus

Laminiinilla on tärkeä rooli perifeerisen hermoston synapsien synnyssä mutta raportit sen tehtävistä keskushermoston synaptogeneesissä ovat harvassa. Kaikki tunnetut synaptiset laminiinit sisältävät β 2-ketjun ja sen poistaminen on toiminut arvokkaana työkaluna etsittäessä vihjeitä laminiinien yhteisvaikutuksista synapseissa (Patton ym. 1997; Libby ym. 2000; Egles ym. 2007). *LAMB2*^{-/-}-hiirillä hippokampuksen, aivokuoren ja pikkuaivojen synapsien tiheys on villityypin hiiriin verrattuna pienempi (Egles ym. 2007). Synapsien rakennetta tarkasteltiin lähemmin hippokampuksessa ja siitä löydettiin lukuisia poikkeavuuksia: synapsirakkulat olivat tavanomaista suurempia ja sijaitsivat

usein kaukana hermovälittäjäaineiden vapautumisalueilta (ns. aktiivisilta alueilta). Synapsirako sekä postsynaptinen tiheys olivat epätavallisin leveitä, ja osa pre- ja postsynaptisista hermopäätteistä olivat virheellisesti vastakkain kohdentuneita tai jopa osittain toisistaan irtautuneita.

Toinen synaptogeneesin kannalta merkittävä $\beta 2$ -laminiinin esiintymispaikka keskushermostossa on retinan ulompi pleksiforminen kerros, jossa fotoreseptorit muodostavat synapseja interneuronien kanssa (Libby ym. 2000). *LAMB2*^{-/-}-hiirten fotoreseptorit vastaavat epänormaalin pienestä koostaan huolimatta valoärsykkeisiin normaalisti, mutta niiden impulssinvälitys interneuroneille on häiriintynyt (Libby ym. 1999). Villityypin hiirillä yksi fotoreseptoripääte yhdistyy tavanomaisesti kahteen horisontaaliseen ja yhteen bipolaariseen soluun. *LAMB2*^{-/-}-hiirillä tällainen synapsikonfiguraatio on harvinainen ja täysin ilman postsynaptisia partnereita on lähes puolet fotoreseptoreista.

LAMB2^{-/-}-hiirillä tehtyjen kokeiden perusteella laminiinin voidaan olettaa vaikuttavan useisiin tapahtumiin keskushermoston synaptogeneesissä. Koska laminiinin puuttuessa pre- ja postsynaptiset hermopäätteet ovat heikosti toisiinsa kiinnittyneitä ja useat synapsit jäävät kokonaan muodostumatta, on todennäköistä, että laminiini toimii hermopäätteiden välisessä vuorovaikutuksessa. Postsynaptisen tiheyden leventyminen *LAMB2*^{-/-}-hiirillä viittaa postsynaptisten molekyylien vajavaiseen konsentraatioon. Nämä havainnot ja ongelmat *LAMB2*^{-/-}-hiirten aktiivisten alueiden muodostumisessa sopivat malliin, jossa laminiini yksin tai yhdessä muiden soluväliaineen molekyylien kanssa yhdistää ja kohdistaa hermopäätteet fyysisesti sekä vuorovaikuttaa pre- ja postsynaptista erilaistumista säätelevien koneistojen kanssa (Egles ym. 2007).

Lähes kaikki tieto mekanismeista, joiden kautta laminiini osallistuu synaptogeneesiin, on peräisin hermo-lihasliitoksen (NMJ) tutkimuksesta. NMJ eroaa sentraalisista synapseista niiden soluväliaineen koostumuksen ja matriksiproteiinien järjestäytymisen suhteen huomattavasti (Barros ym. 2011). Myös synapsien sisältämissä laminiini-isoformeissa on eroja: NMJ sisältää laminiini-221:stä, -421:stä ja -521:stä; hippokampus laminiini-323:sta sekä -423:sta ja retinan ulompi pleksiforminen kerros laminiini-

423:sta ja -523:sta (Patton ym. 1997; Libby ym. 2000; Egles ym. 2007). $\beta 2$ -lamiiniin poistaminen aiheuttaa kuitenkin hyvin samankaltaisia virheitä NMJ:ssa kuin hippokampuksessa: *LAMB2*^{-/-}-hiirten aktiivisten alueiden ja asetyylikoliinireseptorikeskittymiä sisältävien postsynaptisen kalvon poimujen määrä on vähentynyt, synapsirakkulat hajaantuneet ja Schwannin solut tunkeutuneet synapsirakoon (Noakes ym. 1995; Patton ym. 1998; Nishimune ym. 2004; Fox ym. 2007). $\alpha 4$ -lamiiniin suhteen poistogeenisillä hiirillä, joilta puuttuu ainoastaan yksi NMJ:n lamiiniitrimeeristä, aktiiviset alueet ovat organisoituneet normaalisti mutta eivät tavanomaisesta poiketen asetu vastapäätä postsynaptisia poimuja (Patton ym. 2001). Samankaltaisuudet sentraalisten synapsien ja NMJ:n fenotyypissa *LAMB2*^{-/-}-hiirillä viittaavat siihen, että synaptogeneesi keskushermostossa on ainakin osittain samojen lamiiniivälitteisten mekanismien kontrolloimaa kuin NMJ:ssa.

NMJ:n lamiiniinit sitoutuvat $\beta 2$ -lamiiniin kautta presynaptisten hermopäätteiden jänniteriippuvaisiin Ca^{2+} -kanaviin, mikä indusoi kanavien yhteenkertymistä (Nishimune ym. 2004). Aktiiviset alueet muodostuvat synapsirakkuloiden aggregoituessa Ca^{2+} -kanavakertymien yhteyteen. $\beta 2$ -lamiiniini sitoutuu pääasiassa P/Q- ja N-tyypin Ca^{2+} -kanaviin. Nämä vastaavat kalsiumista riippuvaisesta välittäjäaineen vapautumisesta ja niitä esiintyy runsaasti hermo-lihasliitoksen lisäksi sentraalisissa synapseissa (Catterall 2000; Spafford ja Zamponi 2003).

$\alpha 4$ - ja $\alpha 5$ -lamiiniinien sekä dystroglykaanin yhteisvaikutus indusoi postsynaptisen solukalvon dystroglykaanin aggregoitumista ja on välttämätön NMJ:n asetyylikoliinireseptorikertymien muodostumiselle (Nishimune ym. 2008). Dystroglykaani on yleisesti esiintyvä molekyyli myös keskushermoston postsynaptisissa hermopäätteissä ja saattaa osallistua lamiiniivälitteiseen postsynaptiseen erilaistumiseen (Moukhles ja Carbonetto 2001; Zaccaria ym. 2001). Dystroglykaani on tärkeä osa dystrofiini-glykoproteiinikompleksia, joka liittää soluväliaineen molekyylit solun tukirankaan (Henry ja Campbell 1999). Kompleksin komponenttien, dystrofiinin ja dystrobreviinien puuttuminen aiheuttaa sentraalisten synapsien GABA_A-reseptorikertymien koon ja määrän pientymistä (Knuesel ym. 1999; Grady ym. 2006).

Lisäksi mutaatiot dystrofiini-geenissä ja $\beta 2$ -lamiiniin puute näkyvät samanlaisina muutoksina elektroretinogrammeissa ja luultavasti myös samanlaisina puutteina fotoreseptorien synapseissa (Fitzgerald ym. 1994; Pillers ym. 1995; Libby ym. 1999).

Muita mahdollisia keskushermoston synaptogeneesiin osallistuvia lamiiniinireseptoreja ovat integriinit. Integriinejä esiintyy laajalti keskushermostossa ja niiden on osoitettu osallistuvan synaptogeneesiin useissa tutkimuksissa (Chavis ja Westbrook 2001; Chan ym. 2003; Nikonenko ym. 2003; Hama ym. 2004).

Synapsien muodostumisen ja stabiloinnin lisäksi lamiiniinit ovat osa mekanismia, joka aikaansaa pitkäkestoisia muutoksia synapsien toiminnassa. Nämä muutokset voivat joko vahvistaa tai heikentää synapsien toimintaa ja niitä pidetään oppimisen ja muistin perustana (LaMantia 2004). Hippokampuksen leikeviljelmässä lamiiniin hajottaminen plasmiiniesikäsittelyllä häiritsee CA1-alueen synapsien toiminnan pitkäkestoisen vahvistumisen (long-term potentiation, LTP) ylläpitoa mutta ei vaikuta LTP:n syntyyn (Nakagami ym. 2000). Samankaltainen muutos CA1-alueen pyramidaalisolujen LTP:ssa on havaittavissa heterotsygootista $\alpha 3$ -integriinigeenin mutaatiota kantavilla hiirillä tai käsittelemällä hippokampusleikkeet $\beta 1$ - ja $\beta 3$ -integriiniantagonisti ekistatiinilla (Chun ym. 2001; Chan ym. 2003). Koska $\alpha 3$ - ja $\beta 1$ -integriini muodostavat reseptoreja hippokampuksen synaptosomeissa, on mahdollista, että mekanismi, jolla lamiiniini ylläpitää LTP:ta, on $\alpha 3\beta 1$ -integriinivälitteinen (Chan ym. 2003). LTP:n ylläpito saattaa vaatia geeniekspression säätelyllä saavutettavia pitkäaikaisia muutoksia synapsien toiminnassa. Yksi mahdollinen lamiiniini-integriini-vuorovaikutuksen aktivoima ja geeniekspressiota muuttava signaalinvälittäjä on ERK1/2 (solunulkoisten signaalien säätelmä proteiinikinaasi 1/2). Aivokuoren neuroneissa yleisintegriiniligandi, GRGDSP-peptidi aktivoi ERK1/2:n, joka aktivoiduttuaan siirtyy tumaan (Watson ym. 2007).

Pikkuaivojen yhdensuuntaisten ja nousevien hermosyiden samanaikainen, toistuva aktivaatio johtaa yhdensuuntaisten hermosyiden ja Purkinjen solujen välisten synapsien toiminnan pitkäkestoiseen heikentymiseen (engl. long-term depression, LTD) (Hartell 2002). Typistettyä $\alpha 2$ -lamiiniinia tuottavilla hiirillä Purkinjen solujen afferenttien

stimulointi aikaansaa poikkeuksellisesti LTP:n tai tavanomaista vaimeamman LTD:n (Anderson ym. 2005). Yksi LTD:n muodostumisen perusedellytyksistä on Purkinjen solujen riittävä Ca^{2+} -pitoisuus (Hartell 2002). Kun postsynaptisen LTD:n syntyminen estetään Ca^{2+} -kelaattorilla, indusoi toistuva yhdensuuntaisten hermosyiden aktivaatio alkuperältään presynaptisen LTP:n (Jacoby ym. 2001). Koska pikkuaivojen soluissa esiintyy laminiinireseptoreja muodostavien $\alpha 3$ -, $\alpha 6$ - ja $\beta 1$ -integriinialayksikköjen mRNA:ta ja integriinien aktivoitumisen aivokuoren neuroneissa tiedetään lisäävän solunsisäisen kalsiumin määrää, saattaa laminiini osallistua LTD:n muodostumiseen Purkinjen soluissa säätelemällä solunsisäisen kalsiumin pitoisuutta (Chan ym. 2003; Watson ym. 2007). Pikkuaivojen LTD:tä pidetään motorisen oppimisen kannalta keskeisenä tapahtumana ja häiriö sen muodostumisessa saattaa vaikeuttaa $\alpha 2$ -laminiinin puutteesta johtuvaa synnynnäistä lihasdystrofiaa sairastavien henkilöiden motorisia oireita (Hartell 2002).

5 YHTEENVETO

Laminiinit ovat 16 jäsentä käsittävä solunulkoinen, heterotrimeerinen glykoproteiiniperhe ja kaikissa kudoksissa esiintyvien tyvikalvojen pää rakenneosia. Ne vuorovaikuttavat lukuisten soluväliaineen molekyyliden sekä solukalvon reseptorien kanssa ja toimivat mitä erilaisimmissa tehtävissä niin keskushermostossa kuin sen ulkopuolella. Laminiini-isoformien ekspressio on temporaalisesti ja spatiaalisesti säädeltyä ja isoformien rakenne-erojen uskotaan heijastavan kudosspesifejä ominaisuuksia (Durbeej 2010).

Geneettiset tutkimukset hiirillä ovat osoittaneet laminiinien vaikuttavan kaikkiin keskushermoston pääkehitysvaiheisiin. Kokonaiskuva laminiinien tehtävistä keskushermostossa on kuitenkin pirstaleinen. On selvää, että laminiinit eivät esimerkiksi ole universaaleja neuronien migraatiota tai aksonien kasvua ohjaavia molekyylejä, mutta laajuus, jossa laminiinit ohjaavat keskushermoston eri kehitystapahtumia, on yhä melko tuntematon. Toinen heikosti tunnettu alue on laminiinien ja muiden soluväliaineen molekyyliden yhteisvaikutukset

keskushermostossa. Mitkä tekijät säätelevät soluväliaineen koostumusta ja miten soluväliaineen jäsenten ja niiden muodostaman rakenteen sisältämä informaatio yhdistyy soluissa? Koska laminiinit tukevat hermoston kantasolujen ja oligodendrosyyttien selviytymistä sekä neuriittien kasvua, saattavat vastaukset näihin kysymyksiin osoittautua hyödyllisiksi kehitettäessä oligodendrosyyttien ja neuronien regeneraatiota sekä aksonien uudelleenkasvua parantavia hoitoja (Liesi ym. 1984a ja 2001a; Colognato ym. 2002; Hall ym. 2008).

II KOKEELLINEN OSA:
KDI-TRIPLEPTIDIN NEUROPROTEKTIIVINEN VAIKUTUS
6-HYDROKSIDOPAMIINILLA INDUSOIDUSSA PARKINSONIN TAUTI
MALLISSA

6 JOHDANTO

Laminiinit ovat joukko solunulkoisia heterotrimeerisiä glykoproteiineja, jotka esiintyvät pääasiassa osana epiteeli- ja endoteelisolukerroksia, verisuonia sekä monia muita rakenteita ympäröivien tyvikalvojen molekyyliverkkoja (Miner ja Yurchenco 2004; Miner 2008). Laminiinit osallistuvat yksilönkehityksen aikana lukuisiin morfogeneettisiin ja organogeneettisiin tapahtumiin sekä ylläpitävät kudusrakenteiden eheyttä ja kudusraja-alueita. Rakenteellisten roolien lisäksi laminiinit vuorovaikuttavat useiden solukalvon reseptorien kanssa ja erityisesti niiden neuroneihin kohdistuvat vaikutukset ovat herättäneet runsaasti kiinnostusta tiedeyhteisön keskuudessa (Miner 2008). *In vitro* laminiinit ohjaavat neuronien migraatiota ja aksonien kasvua sekä voimistavat neuritiin kasvua ja parantavat neuronien elinkykyä (Manthorpe ym. 1983; Liesi ym. 1984a, 1992, 1995 ja 2001a; Liesi 1985a; Fishman ja Hatten 1993; Gomez ja Letourneau 1994; Kuhn ym. 1995; Chen ja Strickland 1997; Nagai ym. 1999; Chen ym. 2003).

Keskushermostossa laminiinit toimivat pääasiassa kehitystapahtumien säätelijöinä ja niiden ekspressio vähenee kehityksen päätyttyä (Liesi 1985a; Liesi ja Silver 1988; Miner ym. 1998; Farwell ja Dubord-Tomasetti 1999; Egles ym. 2007; Franco ja Müller 2011; Relucio ym. 2012). Laminiiniekspression on kuitenkin todettu lisääntyvän vaurioalueilla trauman tai sairauden seurauksena esimerkiksi Alzheimerin tauti potilaiden β -amyloidiplakkien yhteydessä, amyotrofista lateraaliskleroosia sairastavien

potilaiden selkäytimessä ja rottien kainaattihapolla indusoidussa neostriatum-leesiossa (Liesi ym. 1984b; Murtomäki ym. 1992; Wiksten ym. 2007). Kiinnostavan tästä havainnosta tekee se, että astrosyyttien jatkuva laminiiniekspressio näyttäisi olevan tekijä, joka erottaa toisistaan uusiutuvan keskushermoston ja keskushermoston, jossa regeneraatiota ei tapahdu (Hopkins ym. 1985; Liesi 1985b). Vaurioalueen laminiinituotanto saattaa olla regeneraatiota tukeva toimenpide, vaikka sen vaikutukset näyttävätkin riittämättömiltä.

Hermokasvutekijämäisistä ominaisuuksista johtuen laminiineja tai sen fragmentteja on useasti ehdotettu käytettäväksi neurodegeneratiivisten sairauksien ja aivo/selkäydinvaurioiden hoidossa. Monet laminiinin sitoutumisinteraktioihin osallistuvista ja yksittäisiä vaikutuksia välittävistä domeeneista on paikannettu (Luckenbill-Edds 1997). Yksi laminiinin neuriittien kasvua parantavista ja neuronien migraatiota sekä aksonien kasvua ohjaavista domeeneista sijaitsee γ 1-laminiiniketjun C-terminaaliosassa (Liesi ym. 1989 ja 1995; Matsuzawa ym. 1996, 1998). Pienin γ 1-ketjun fragmentti, joka yhä edistää neuriittien kasvua, on KDI-tripeptidi (lysiini-asparagiinihappo-isoleusiini) (Liesi ym. 2001b). KDI:n vaikutuksia on mitattu useissa hermovauriomalleissa ja se on osoittautunut tehokkaaksi neuroneita suojelevaksi ja regeneraatiota parantavaksi yhdisteeksi (Liebkind ym. 2003; Wiksten ym. 2004a ja 2004b; Väänänen ym. 2006). *In vitro* KDI-peptidi kumoaa myeliini- ja gliasoluperäisten molekyylien neuriittien kasvua estävät vaikutukset, ja sen on osoitettu edistävän selkäytimen katkaisun jälkeistä hermosoluyhteyksien uudelleenmuodostumista ja takaraajojen halvauksen paranemista rotilla (Liebkind ym. 2003; Wiksten ym. 2004b). KDI:n tiedetään myös suojelevan hippokampuksen ja aivokuoren neuroneita hippokampukseen injisoidun kainaattihapon aiheuttamalta solukuolemalta (Wiksten ym. 2004a).

KDI-peptidin vaikutusmekanismit ovat suurelta osin tuntemattomia ja mitä luultavimmin hyvin monimutkaisia ottaen huomioon sen vaikutusten luonteen ja moninaisuuden. KDI:n hermosoluja suojelevat ja regeneraatiota parantavat ominaisuudet saattavat liittyä sen kykyyn toimia ei-kilpailevana ionotrooppisten

glutamaattireseptorien salpaajana (Möykkynen ym. 2005). N-metyyli-D-aspartaattireseptorien liiallisesti aktivaatiosta seuraavaa solukuolemaa pidetään yhtenä merkittävänä patogeneettisenä mekanismina useiden neurodegeneratiivisten sairauksien, kuten Parkinsonin taudin sekä traumaattisten ja iskeemisten aivovaurioiden taustalla (Pedersen ja Schmidt 2000). KDI-peptidin ja KDI-sekvenssin sisältävän, γ 1-laminiinissa esiintyvän dekapeptidin (P1543) tiedetään myös indusoivan K^+ -virtoja G-proteiinikytkentäisellä mekanismilla, mutta tämän merkitys on vielä epäselvä (Liesi ym. 2001b). Löydös synnyttää kuitenkin tärkeitä KDI:n käyttöturvallisuuteen liittyviä kysymyksiä, sillä P1543 on korkeina pitoisuuksina neurotoksinen. Toksisuus johtuu luultavasti solukalvon depolarisaation aikaansaamasta solunsisäisen Ca^{2+} -pitoisuuden noususta, joka käynnistää solukuolemaan johtavan tapahtumaketjun. Näin ollen KDI:n mahdolliset neurotoksiset vaikutukset *in vivo* tulee tutkia perinpohjaisesti ennen kuin sen käyttöä terapiaan voidaan harkita.

Parkinsonin tauti (PD) on Alzheimerin taudin jälkeen yleisin neurodegeneratiivinen sairaus, ja siihen sairastuu arviolta 2 % yli 65-vuotiaista (Blum ym. 2001; Dauer ja Przedborski 2003). Taudille tyypillisiä oireita ovat lepovapina, lihasjäykkyys, bradykinesia ja liikkeiden aloittamisen vaikeus (Dauer ja Przedborski 2003). PD:n selkeimmät patologiset löydökset ovat liikkeiden säätelyyn osallistuvan nigrostriataalisen dopamiiniradan hermosolujen tuhoutuminen ja neuronien sisälle kertyneet proteiiniaggregaatit, niin sanotut Lewyn kappaleet. Nigrostriataalisen dopamiiniradan hermosolut sijaitsevat substantia nigra *pars compactassa* (SNpc) ja niiden aksonit vievät aivokuorukkaan (*putamen*) ja häntätumakkeeseen (*nucleus caudatus*). Tehokkaista kompensatiomekanismeista johtuen PD:n kliiniset oireet ilmenevät vasta kun n. 60 % SNpc:n dopaminergisista soluista ovat kuolleet ja n. 80 % aivokuorukan dopamiinista on hävinnyt (Bernheimer ym. 1973).

Parkinsonin taudin etiologia on toistaiseksi tuntematon mutta dopamiinihermosolujen tuhoutumisen taustalla epäillään olevan proteiinien laskostumisvirheitä, mitokondrioiden toiminnanhäiriöitä ja solujen rakenteita vaurioittavien vapaiden happiradikaalien muodostumista (Dauer ja Przedborski 2003). Koska PD:n tarkkaa

etiologiaa ei tunneta ja taudin oireet ilmaantuvat vasta, kun merkittävä osa SNpc:n dopaminergisistä soluista ovat kuolleet, sairauden puhkeamisen estävien tai sen etenemisen pysäyttävien lääkkeiden kehittäminen on ollut vaikeaa. PD:n hoito perustuu pääasiassa striatumin dopamiinivajauksen korjaamiseen. Saatavilla oleviin lääkkeisiin kuuluvat esimerkiksi dopamiiniagonistit, dopamiinin hajoamista hidastavat monoamiinioksidaasi-B:n estäjät sekä dopamiinin esiaste levodopa ja sen perifeeristä metaboliaa hidastavat dopadekarboksylaasin ja katekoli-O-metyyylitransferaasin estäjät (LeWitt 2008; Poewe 2009). Mikään tunnettu yhdiste ei korjaa syntyneitä hermokudosvauriota eikä pysäytä PD:n etenemistä. Ratkaisua PD:n parantamiseen on etsitty aivokuorukan kantasoluterapiasta ja erilaisista, hermosolujen elinkykyä parantavista hermokasvutekijöistä (katsausartikkeleita aiheesta: Lindvall ja Björklund 2004; Chiocco ym. 2007). Lupaavista *in vivo* tutkimustuloksista huolimatta kantasolu- ja hermokasvutekijähoidot eivät ole menestyneet kliinisissä kokeissa.

Hermovauriomalleilla tehtyjen tutkimusten tulokset antavat toiveita siitä, että KDI-tripeptidiä voitaisiin käyttää Parkinsonin taudin hoitoon (Wiksten ym. 2004a, 2004b; Liebkind ym. 2003). KDI:ta on jo tutkittu neurotoksiini, 6-hydroksidopamiinilla (6-OHDA) indusoidussa, toispuoleisessa Parkinsonin tauti mallissa rotilla (Väänänen ym. 2006). Tutkimuksessa KDI ja 6-OHDA injisoitiin substantia nigraan 5 minuutin väliajoin ja muodostuneen leesio koon koko mitattiin seitsemän päivän kuluttua injektioista. KDI-peptidin todettiin säästävän yli 30 % substantia nigran tyrosiinihydroksylaasi (TH)-positiivisista, dopaminergisistä hermosoluista. Näin voimakas neuroprotektiivinen vaikutus ihmisissä merkitsisi Parkinsonin taudin oireiden häviämistä tai merkittävää lieventymistä (Bernheimer ym. 1973). KDI:n tehoa ei kuitenkaan tutkittu käyttäytymiskokein eikä sen annos-vastetta tunneta, koska tutkimuksessa käytettiin ainoastaan yhtä annostasoa.

Tämän erikoistyötutkimuksen tarkoituksena oli täydentää ja vahvistaa tietoa KDI:n vaikutuksista *in vivo* 6-OHDA:lla indusoidussa Parkinsonin tautimallissa. Tutkimuksessa KDI-tripeptidi tai saliini injisoitiin stereotaktisessa leikkauksessa Wistar-kannan rottien striatumiin 6 tuntia ennen 6-OHDA-infusiota. KDI-käsittelyn

vaikutusta muodostuvan leesion suuruuteen arvioitiin mittaamalla D-amfetamiinilla indusoitua pyörimiskäyttäytymistä 2, 4 ja 6 viikkoa leikkausten jälkeen sekä laskemalla SNpc:n TH:a ekspressoivat hermosolut ja määrittämällä striatumin optinen tiheys.

7 TUTKIMUKSESSA KÄYTETTYJEN MENETELMIEN VALINTA

7.1 6-hydroksidopamiini-malli

6-OHDA on yksi käytetyimmistä neurotoksiineista, jolla voidaan aiheuttaa PD:a jäljittelevä nigrostriataalisen hermoradan degeneraatio (Blum ym. 2001). 6-OHDA:n potentiaali PD:n mallintamisessa löydettiin 60-luvun lopulla, jolloin sen osoitettiin hävittävän dopaminergisten solujen ja niiden terminaalien dopamiinisäilytys substantia nigraan injisoituna (Ungerstedt 1968). Leesion tekeminen tavanomaisesti toispuoleisia, jolloin tervettä aivopuoliskoa voidaan käyttää kontrollina leesion kokoa arvioivissa morfologisissa ja biokemiallisissa määrittämissä. Näitä ovat esimerkiksi striatumin dopaminergisten aksonien tiheyden tai striatumin dopamiinipitoisuuden määrittäminen ja substantia nigraan dopaminergisten hermosolujen määrän laskeminen. Toispuoleinen lesio johtaa asymmetriseen motoriseen käyttäytymiseen, jonka voimakkuutta voidaan tutkia erilaisin käyttäytymiskokein kuten mittaamalla dopaminergiseen järjestelmään vaikuttavilla lääkkeillä indusoitua pyörimiskäyttäytymistä tai hienomotorista suorituskkyä portaikko-kokeessa (Ungerstedt ja Arbuthnott 1970; Montoya ym. 1991).

6-OHDA muistuttaa rakenteeltaan katekoliamiineja ja kulkeutuu katekoliaminergisiin soluihin aktiivisten dopamiinin ja noradrenaliinin kuljetusproteiinien avulla (Jonsson 1980). Aktiivisen soluunoton vuoksi 6-OHDA:n vaikutukset rajautuvat katekoliaminergisiin hermosoluihin. 6-OHDA on hyvin reaktiivinen yhdiste, joka hapettuu spontaanisti tai monoamiinioksidaasin vaikutuksesta ja muodostaa useita toksisia lajikkeita kuten kinoneja, vetyperoksidia sekä superoksidi- ja hydroksyyli- ja -radikaaleja (Blum ym. 2001). Nämä yhdisteet vaurioittavat solujen makromolekyylejä sekä mitokondrioita ja laukaisevat ohjelmoidun solukuoleman. 6-OHDA:lla epäillään olevan myös happiradikaaleista riippumaton, mitokondrioiden toimintaa häiritsevä vaikutus (Glinka ja Youdim 1995; Lotharius ym. 1999).

6-OHDA ei läpäise veri-aivoestettä joten se täytyy injisoida suoraan aivokudokseen (Blum ym. 2001). Koska PD-malleissa pyritään yleensä tuottamaan dopaminergisiin hermosoluihin rajoittuva vaurio, voidaan 6-OHDA:n soluunotto noradrenergisiin hermosoluihin estää käyttämällä noradrenaliini-transportterin toimintaa estäviä yhdisteitä kuten desipramiinia.

PD:a mallintava 6-OHDA-leesio nigrostriataalisissa radassa voidaan tuottaa injisoimalla 6-OHDA joko SNpc:aan, mediaaliseen etuaivojen kimppuun tai striatumiin. Injektio SNpc:aan tai mediaaliseen etuaivojen kimppuun saa aikaan nopean ja lähes täydellisen SNpc:n neuronien degeneraation eikä sovellu neuroprotektion tai regeneraation tutkimiseen nigrostriataalisessa järjestelmässä (Perese ym. 1989; Carman ym. 1991; Björklund ym. 1997). Striatumiin injisoituna 6-OHDA tuhoaa injektiopaikkaa ympäröivän alueen dopaminergiset aksonit ja hermopäätteet, mitä seuraa kolmivaiheinen, hitaasti etenevä SNpc:n solujen tuhoutuminen (Lee ym. 1996; Sauer ja Oertel 1994). Ensimmäisenä viikkona SNpc:n solujen koko pienenee noin 20 % mutta niiden lukumäärä ei muutu. Noin viikon kuluttua alkaa solujen määrän nopea lasku, joka päättyy neljän viikon kuluttua leesioinnista. Tätä vaihetta seuraa hidas, mahdollisesti useita kuukausia kestävä surkastuneiden solujen katoaminen tai spontaani palautuminen. Leesion koko on riippuvainen 6-OHDA:n määrästä ja injektiopaikasta striatumissa (Lee ym. 1996).

Erikoistyössä käytetty striatum-leesio muistuttaa varhaista PD:a ihmisillä, koska siinä osa SNpc:n soluista ja niiden aksoneista ovat yhä elinkykyisiä ja solutuho etenee suhteellisen hitaasti (Björklund ym. 1997). Tälle leesiolle tyypillisten vahingoittuneiden ja surkastuneiden neuronien uskotaan olevan regeneraatiolla ja nigrostriataalisen radan toiminnan palautumisella tärkeitä vaikutuskohteita. Tästä syystä striatum-leesiota pidetään 6-OHDA:lla indusoiduista PD-malleista soveltuvimpana kasvutekijöiden vaikutusten tutkimukseen. Erikoistyössä tutkittu KDI-peptidi injisoitiin aivoihin kuusi tuntia ennen 6-OHDA:a. PD-malleissa toistaiseksi tutkituimmalla kasvutekijällä, GDNF:llä (glia-solulinjasta peräisin oleva neurotrooppinen tekijä) suoritetussa tutkimuksessa kuuden tunnin injektioväliä käyttämällä saavutettiin merkittävästi

voimakkaampi substantia nigra ja ventraalisen tegmentaalisin alueen dopaminergisia hermosoluja suojeleva vaikutus kuin tunnin tai 12 tunnin injektioväliä käyttämällä (Kearns ym. 1997). Tutkimuksessa GDNF:n neuroprotektiivisen vaikutuksen osoitettiin olevan riippuvainen uusien proteiinien synteesistä, joka oli voimakkaimmillaan kuusi tuntia GDNF-injektioista. Injektioväli ei luultavasti ole yhtä tärkeä silloin, kun injektioaikkana on Kearnsin ja kumppanien (1997) käyttämän substantia nigra sijaan striatum. Kuuden tunnin injektioväli tarjoaa kuitenkin turvallisen lähtökohdan tutkittaessa yhdistettä, jonka vaikutusmekanismit ovat lähes tuntemattomia.

7.2 Ungerstedtin pyörimismalli

6-OHDA:lla aiheutettujen nigrostriataalisen radan toispuoleisten leesioden laajuuden arviointiin ja kasvutekijäkäsittelyjen motoriseen suorituskyykyyn kohdistuvien vaikutusten mittaamiseen käytetään yleisesti Ungerstedtin pyörimismallina tunnettua käyttäytymiskoetta (Ungerstedt ja Arbuthnott 1970). Pyörimismallissa dopamiinijärjestelmää aktivoidaan erilaisilla yhdisteillä, mikä johtaa eläimen stereotyyppiseen pyörimiseen suuremmasta dopamiiniaktiivisuudesta poispäin. Yleisimmät käytetyt yhdisteet ovat dopamiiniagonisti apomorfiini ja D-amfetamiini. Denervaation aiheuttamasta dopamiinireseptorien lukumäärän lisääntymisestä johtuen apomorfiini stimuloi dopamiinireseptoreja pääasiassa leesiopuolella, mistä seuraa koe-eläimien pyöriminen kontralateraaliseen suuntaan eli leesiosta poispäin (Creese ym. 1977; Creese ja Snyder 1979; Hudson ym. 1993). Dopamiinireseptorien yliherkkyyttä ei kuitenkaan havaita ennen kuin nigrostriataalinen rata on lähes täysin tuhoutunut joten apomorfiinilla indusoitua pyörimistä ilmenee vain eläimillä, joiden striatumin dopamiinipitoisuus on alle 90 % normaalista (Hefti ym. 1980). D-amfetamiini lisää dopamiinin määrää synapsiraossa sitoutumalla dopamiinitransportteriin ja kääntämällä tämän toiminnan (Jones ym. 1998). Dopamiinitransportteri pumppaa tällöin dopamiinia hermopäätteestä synapsirakoon ja estää sen takaisinottoa hermopäätteeseen. Koska dopaminergisten hermosolujen päätteet ovat tuhoutuneet leesiodulla aivopuoliskolla, vapauttaa D-amfetamiini dopamiinia hermopäätteistä pääasiassa terveellä aivopuoliskolla ja koe-eläimet pyörivät leesion suuntaan eli ipsilateraalisesti.

Apomorfiinista poiketen D-amfetamiinilla indusoitu pyörintä alkaa intrastriataalisen 6-OHDA-injektion jälkeen jo, kun noin 30 % SNpc:n TH-IR soluista ovat tuhoutuneet ja striatumin dopamiinipitoisuus on laskenut 40-50 % (Lee ym. 1996). Tästä syystä D-amfetamiinilla indusoidun pyörimiskäyttäytymisen mittaaminen valittiin erikoistyössä käytettävän osittaisleesion tutkimiseen. Pyörimiskäyttäytymistä mitattiin leesion aktiivisessa laajentumisvaiheessa 2 ja 4 viikkoa leesioidinnin jälkeen ja leesion koon tasaannuttua 6 viikon kuluttua leesioidinnista. Tämä antaa hyvän kokonaiskuvan KDI-käsittelyn vaikutuksesta nigrostriataalisen järjestelmän toimintaan ja rottien motoriikkaan.

7.3 Tyrosiinihydroksylaasi-immunohistokemia

TH on dopamiinisynteesin ensimmäinen ja nopeutta rajoittava entsyymi, joka muuttaa tyrosiinin L-dihydroksi-fenyylialaniiniksi (Levitt ym. 1965). Tyrosiinihydroksylaasia syntetisoivat ainoastaan katekoliaminergiset solut ja se on hyvä merkkiproteiini osoittamaan elinkykyiset, dopaminergiset neuronit substantia nigraassa. 6-OHDA-käsittelyn jälkeisen TH-IR solujen määrän laskun on osoitettu useissa tutkimuksissa edustavan solujen kuolemaa eikä esimerkiksi TH:n ekspression vähentymistä (Ichitani ym. 1991, 1994; Sauer ja Oertel 1994; Przedborski ym. 1995).

8 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

8.1 Käytetyt materiaalit

3,3'-diaminobentsidiini tetrahydrokloridihydraatti	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat
6-hydroksidopamiinihydrokloridi	Sigma-Aldrich, Stenheim, Saksa
ABC-reagenssipakkaus, Vectastain Elite PK-6100®	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornia, Yhdysvallat
D-amfetamiini sulfaatti	Farmaseuttisen kemian osasto, Helsingin yliopisto, Helsinki, Suomi
desipramiinihydrokloridi	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat
etanoli 96 % (v/v), Etax A®	Altia, Rajamäki, Suomi
etanoli 99 % (v/v), Etax Aa®	Altia, Rajamäki, Suomi
fosfaattipuskuroitu suolaliuos histokemiaan	Bioteekniikan instituutti, Helsingin yliopisto, Helsinki, Suomi
isofluraani	Baxter Medical, Kista, Ruotsi
KDI-tripeptidi 10 µg/µl	Biofarmasian osasto, Helsingin yliopisto, Helsinki, Suomi
ksyleeni	Merck KGaA, Darmstadt, Saksa
L(+)-askorbiinihappo	Sigma-Aldrich, Stenheim, Saksa
Lidokaiini-adrenaliini 10 mg/ml	Orion Pharma, Espoo, Suomi
metanoli	VWR International, Leicester, Iso-Britannia
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Saksa
NaCl-liuos 0,9 %	Frasenius Kabi, Halden, Norja
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Saksa
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Saksa
normaali hevosen seerumi	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornia, Yhdysvallat
paraformaldehydi	VWR International, Haasrode, Belgia
fosfaattipuskuroitu salini-glyseroli-etyleeniglykoli-liuos	Bioteekniikan instituutti, Helsingin yliopisto, Helsinki, Suomi
pentobarbitaalinatrium 60 mg/ml, Mebunat Vet®	Orion Pharma, Espoo, Suomi
Pertex®	Histolab, Gothenburg, Ruotsi
primaarivasta-aine: hiiren anti-TH, MAB-318	Chemicon, Temecula, Kalifornia, Yhdysvallat
sekundaarivasta-aine: biotinyloitu hevosen vasta-aine hiirelle, BA2001	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornia, Yhdysvallat
sukroosi	Riedel-de Haën/Sigma-Aldrich Labor chemikalien GmbH, Saksa
tislattu vesi, valmistettu Milli-Ro 12 PLUS -laitteella	Millipore, Billerica, Massachusetts, Yhdysvallat
tramadolihydrokloridi 50 mg/ml, Tramal®	Orion Pharma, Espoo, Suomi
triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt, Saksa
UHQ-vesi, valmistettu Simplicity 185 -laitteella	Millipore, Billerica, Massachusetts, Yhdysvallat
vetyperoksidi 30 %	J.T. Baker, Deventer, Hollanti

8.2 Liuosten valmistus

8.2.1 Stereotaktisessa leikkauksessa käytetyt liuokset

Askorbiinihappoliuos 0,02 % (w/v): 5 mg L(+)-askorbiinihappoa liuotettiin 25 ml:aan NaCl:a (0,9 %). Liuos säilytettiin ruskeassa lasipullossa, jääkaapissa ja käytettiin viikon kuluessa valmistuksesta.

6-hydroksidopamiiniliuos n. 4 µg/µl: 1 mg 6-OHDA-HCl:a liuotettiin 206 µl:aan 0,02 % askorbiinihappoliuosta juuri ennen käyttöä. Liuos säilytettiin valolta suojattuna jäähauteessa ja sen väri tarkastettiin mahdollisen hapettumisen merkkien havainnoimiseksi ennen käyttöä. Liuosta käytettiin 2-3 leikkaukseen (noin 40-80 minuutin aikana), jonka jälkeen se vaihdettiin tuoreeseen liuokseen.

KDI-tripeptidi liuos: 10 µg/µl KDI-tripeptidiä sisältävä kantaliuos säilytettiin -80°C:ssa ja laimennettiin tarvittavaan pitoisuuteen (0,25; 0,75; 2,5 ja 7,5 µg/µl) 0,9 % NaCl-liuoksella juuri ennen käyttöä. Laimennettu KDI-liuos säilytettiin valolta suojattuna jäähauteessa ja käytettiin 48 tunnin kuluessa valmistuksesta.

Desipramiiniliuos 15 mg/ml: 85,25 mg desipramiinihydrokloridia liuotettiin 5 ml:aan UHQ-vettä ja säilytettiin huoneenlämmössä lasipullossa. Liuos käytettiin 8 tunnin kuluessa valmistuksesta.

Tramadoliliuos 1 mg/ml: 1 ml:n Tramal® 50 mg/ml ampulli laimennettiin mittapullossa 0,9 % NaCl-liuoksella 50 ml:n tilavuuteen. Valmis liuos säilytettiin folioon käärityssä lasipullossa huoneenlämmössä.

D-amfetamiiniliuos 2,5 mg/ml: 13,64 ml D-amfetamiinisulfaattia liuotettiin 4 ml:aan 0,9 % NaCl:a juuri ennen käyttöä.

8.2.2 Perfuusiossa käytetyt liuokset

Fosfaattipuskuri 0,1 mol/l pH 7,4 (PB): 17,8 g Na₂HPO₄ · 2H₂O tai 14,2 g Na₂HPO₄ punnittiin mittapulloon ja liuotettiin litran tilavuuteen tislattulla vedellä. Liuoksen pH

määritettiin pH-mittarilla ja säädettiin pH 7,4:ään liuoksella, joka sisälsi 13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ad 1 l tislattua vettä. Liuos säilytettiin jääkaapissa ja käytettiin 14 päivän kuluessa valmistuksesta.

0,9 % NaCl fosfaattipuskurissa (PBS): 9 g NaCl:a punnittiin mittapulloon ja liuotettiin litran tilavuuteen PB:lla. Liuos säilytettiin jääkaapissa ja hävitettiin 14 päivän kuluessa PB:n valmistuksesta.

Paraformaldehydiliuos 20 %: 100 g paraformaldehydiä liuotettiin 300-400 ml:aan tislattua vettä ja lämmitettiin 60-70°C:een. Kuumaan liuokseen lisättiin 1 tai 5 mol/l NaOH-liuosta kunnes liuos muuttui kirkkaaksi. Liuokseen lisättiin tislattua vettä kunnes sen tilavuus oli 500 ml, minkä jälkeen liuos suodatettiin ruskeaan lasipulloon. Liuos säilytettiin jääkaapissa ja käytettiin 7 päivän kuluessa valmistuksesta.

Paraformaldehydiliuos 4 %: 20 % paraformaldehydiliuos laimennettiin PB:lla 4 %:iin juuri ennen käyttöä.

Sukroosiliuos 20 %: 200 g sukroosia ad 1000 ml PB. Valmis liuos säilytettiin jääkaapissa ja käytettiin 14 päivän kuluessa valmistuksesta.

8.2.3 Immunohistokemiassa käytetyt liuokset

Metanoli-vetyperoksidiliuos: 800 µl:aan PBS:a lisättiin 100 µl:aa metanolia ja 100 µl:aa 30 % vetyperoksidia.

Esi-inkubaatioliuos: 0,95 ml:aan PBS:a lisättiin 20 µl:aa normaali hevosen seerumia ja 30 µl:aa PBS:lla laimennettua, 10 %:n Triton X-100 -liuosta.

Primaarivasta-aineliuos 1:2000: 0,5 µl:aa hiiren anti-TH MAB-318 vasta-ainetta lisättiin 1 ml:aan esi-inkubaatioliuosta.

Sekundaarivasta-aineliuos 1:200: 970 µl:aan PBS:a lisättiin 5 µl:aa biotinyloitua hevosen vasta-ainetta hiirelle (BA2001) ja 30 µl:aa PBS:lla laimennettua, 10 % Triton X-100 -liuosta.

ABC-liuos: Liuos valmistettiin Vectorin ABC-pakkauksen mukana tulleiden ohjeiden mukaan 30 minuuttia ennen käyttöä lisäämällä 5 ml:aan PBS:a 1 tippa A-liuosta. Tämän jälkeen liuos sekoitettiin huolellisesti, siihen lisättiin 1 tippa B-liuosta ja sekoitettiin uudelleen.

Diaminobentsidiini (DAB)-kantaliuos: 0,5 g 3,3'-Diaminobentsidiini tetrahydrokloridihydraattia liuotettiin 100 ml:aan UHQ-vettä ja jaettiin tummanruskeisiin Eppendorf-putkiin. Kantaliuos säilytettiin -20°C:ssa.

DAB-liuos: 0,9 ml:aan PBS:a lisättiin 100 µl:aa DAB-kantaliuosta ja 1 µl 30 % H₂O₂ juuri ennen käyttöä. DAB-liuos suojattiin valolta mahdollisimman tehokkaasti käsittelyn aikana.

8.3 Koe-eläimet

Kokeissa käytettiin Wistar-kannan urosrottia (Harlan, Boxmeer, Alankomaat), jotka tuotiin Farmakologian ja toksikologian osastolle noin viikko ennen leikkausten aloittamista. Rotat saapuivat kahdessa erässä: 15.1.2009 osastolle saapuneeseen erään kuului 36 rottia (NP1-koesarja) ja 26.3.2009 saapuneeseen erään 24 rottia (NP2-koesarja). Eläinhuoneen valorytmi oli 12/12 tuntia, lämpötila n. 20°C ja suhteellinen ilmankosteus n. 50 %. Rotat elivät kolmen tai neljän yksilön häkeissä, jotka vaihdettiin puhtaisiin kerran viikossa, ja niillä oli saatavilla kuivaruokaa (Harlan Teklad Global Diet, Boxmeer, Alankomaat) ja vesijohtovettä *ad libitum*. Rottien vointia ja käyttäytymistä seurattiin päivittäisillä tarkastuksilla. Leikkauksia seuranneen vuorokauden rotat toipuivat yksittäishäkeissä, jonka jälkeen ne palautettiin yhteishäkkeihin.

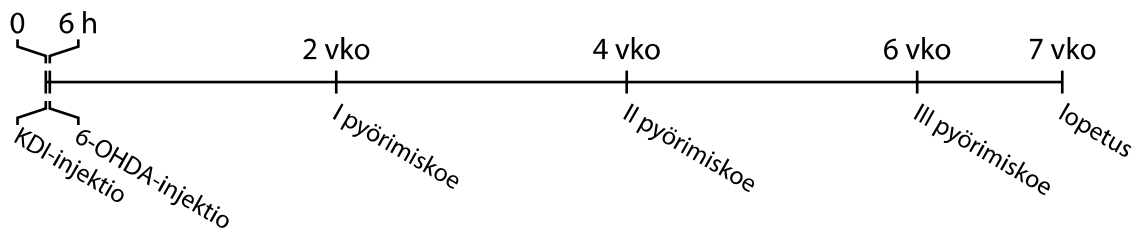
8.4 Stereotaktinen leikkaus sekä KDI- ja 6-OHDA-infuusiot

Stereotaktisessa leikkauksessa rotan oikeaan striatumiin injisoitiin ensin KDI-tripeptidi tai saliini ja kuusi tuntia tämän jälkeen 6-OHDA (kuva 3.). Injektiopaikka valittiin substantia nigra dopaminergisten neuronien päätealueelta striatumista rotan aivoatlaksen avulla (Paxinos ja Watson 1998). Sen koordinaatit olivat 1,0 mm

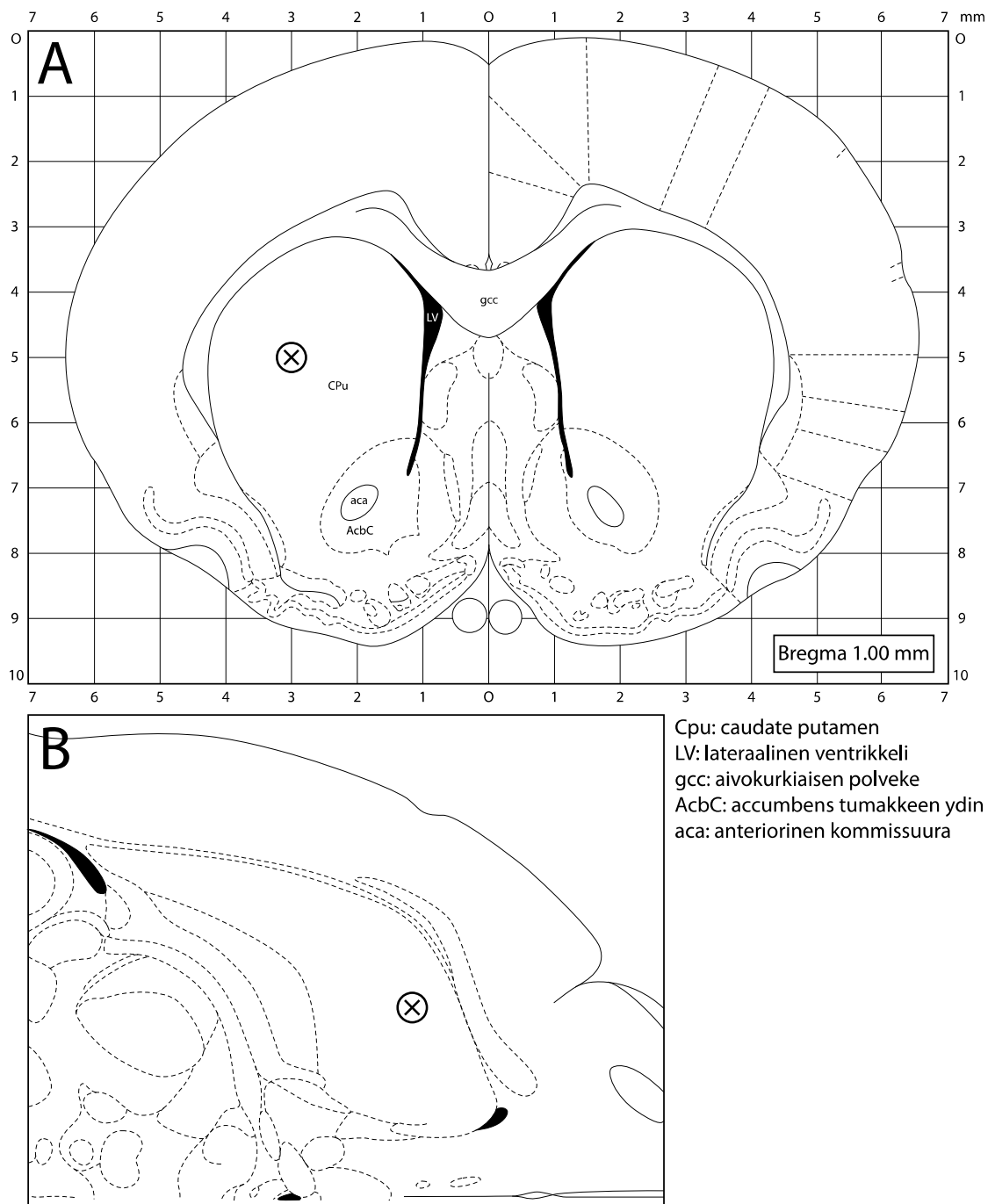
anteriorisesti ja 3,0 mm lateraalisesti bregmasta (kallon luusaumojen risteyskohta) sekä 5,0 mm ventraalisesti kovakalvon pinnasta (kuva 4.). Leikkausta varten eläimet punnittiin ja satunnaistettiin käsittelyryhmiin (taulukko 2). Eläinten keskipaino leikkauspäivänä oli 280 ± 14 g (keskiarvo \pm keskihajonta). Käytetty KDI:n määrä oli 0 (saliini-kontrolli), 1, 3, 10 tai 30 μg :aa ja 6-OHDA:n määrä 16 μg :aa.

Taulukko 2: Stereotaktisten leikkausten käsittelyryhmät ja ryhmäkoot. Rotat saapuivat ja leikattiin kahdessa erässä. Ensimmäisen saapumiserän rotat kuuluvat koesarjaan NP1 (neuroprotektio 1.) ja toisen saapumiserän koesarjaan NP2 (neuroprotektio 2.).

Koesarja	1. käsittely	2. käsittely	Ryhmän koko	
NP1 NP2	saliini	16 μg 6-OHDA	n=9 n=8	yhteensä n=17
NP2	1 μg KDI	16 μg 6-OHDA	n=8	
NP1 NP2	3 μg KDI	16 μg 6-OHDA	n=9 n=8	yhteensä n=17
NP1	10 μg KDI	16 μg 6-OHDA	n=9	
NP1	30 μg KDI	16 μg 6-OHDA	n=9	



Kuva 3: Koesarjan aikajana.



Kuva 4: KDI-tripeptidi- ja 6-OHDA-infuusioiden sijainti rotan striatumissa. Injektiopaikka on merkitty kuviin rastilla. (A) koronaalinen leikekuva 1,0 mm rostraalisesti bregmasta (kuva Paxinos ja Watson 1998 mukaillen). (B) lateraalinen, sagittaalinen kuva (kuva Kirik ym. 1998 mukaillen).

Leikkaus aloitettiin asettamalla rotta induktiokammioon, jonne johdettiin n. 4,5 % isofluraanikaasua. Anestesian syvyyttä tarkkailtiin niin induktion kuin koko leikkauksen ajan seuraamalla rotan varvasrefleksejä sekä hengityksen syvyyttä ja tiheyttä. Varvasrefleksin hävittyä rotta siirrettiin kammioista leikkauspöydälle nukutusmaskiin ja isofluraanipitoisuutta laskettiin n. 3,5 %:iin. Rotta kiinnitettiin stereotaktiseen laitteeseen (Stoelting Co, Wood Lane, Illinois, Yhdysvallat) korvakäytävistä ja etuhampaista ja sen päälaki ajeltiin karvoista. Päälaen ihoon leikattiin saksilla n. 1,5 cm:n pitkittäinen haava johon tiputettiin lidokaiini-adrenaliiniliuosta kipua lievittämään ja verenvuotoa vähentämään. Päänahan alla olevaan lihas- ja kalvokerrokseen leikattiin kirurginveitsellä kalloon asti ulottuvat ristikkäiset viillot ja haava levitettiin suonipuristimilla. Käytettyä isofluraanipitoisuutta yleensä laskettiin tämän vaiheen jälkeen ja mahdollisuuksien mukaan asteittain leikkauksen loppua kohti, jotta rotan toipumisaika leikkauksesta olisi mahdollisimman lyhyt. Kallon pinta puhdistettiin 70 %:n etanolilla ja luusaumojen risteyskohta, bregma, merkittiin tarkasti mustalla huopakynällä.

Kallonsisäiset infuusiot suoritettiin automaattisella mikroinjektorilla (Stoelting Co Model 310, Wood Lane, Illinois, Yhdysvallat) käyttämällä Hamilton-mikrolitruiskuja (Hamilton Bonaduz AG 701N, Bonaduz, Sveitsi). Jokaiselle yhdisteelle oli varattu oma ruisku, joka huuhdeltiin 70 %:n etanolilla ja puhdistetulla vedellä aina ennen käyttöä. Huuhtelun jälkeen ruisku täytettiin KDI-peptidiliuoksella tai saliinilla, kiinnitettiin mikroinjektoriin ja vietiin tarkasti bregman yläpuolelle. Injektiopaikka haettiin liikuttamalla ruiskua 1,0 mm anteriorisesti ja 3,0 mm lateraalisesti. Paikka merkittiin huopakynällä ja siihen porattiin kallon läpäisevä reikä. Mikrolitruiskun neulankärki vietiin injektiopaikalle ja ruiskun toimivuus tarkastettiin. Neulankärki laskettiin tämän jälkeen ensin kovakalvon pintaan ja tästä ventraalisesti 5,0 mm. Infuusion aikana rotalle annettiin 1 mg/kg tramadolia ihon alle leikkauksen jälkeistä kipua lievittämään. Infuusion päätyttyä neulan annettiin olla injektiopaikalla vielä kolmen minuutin ajan takaisinvirtauksen estämiseksi, jonka jälkeen haava puhdistettiin 70 %:n etanolilla ja ommeltiin kiinni. Rotta asetettiin toipumishäkkiin heräämään ja palautettiin omaan yhteishäkkiinsä leikkauksia seuraavana päivänä.

Ensimmäisessä leikkauksessa käytetty KDI-liuos laimennettiin kantaliuoksesta saliinilla juuri ennen käyttöä ja säilytettiin valolta suojattuna jäähauteessa. Kontrolliryhmässä käytettiin saliniä. KDI ja saliini-infusioiden tilavuus oli 4 µl ja injektionopeus 0,75 µl/min. Valmistetut KDI-pitoisuudet olivat 0,25; 0,75; 2,5 ja 7,5 µg/µl ja kokonaisannokset 1, 3, 10 tai 30 µg KDI-peptidiä. KDI-liuos vaihdettiin tuoreeseen 48 tuntia valmistuksen jälkeen.

Viimeistään puoli tuntia ennen 6-OHDA-infusiota rotille annosteltiin 15 mg/kg desipramiiniliuosta vatsaonteloon. Desipramiini estää 6-OHDA:n soluunottoa noradrenergisiin hermopäätteisiin, jolloin 6-OHDA:n toksinen vaikutus kohdentuu entistä tehokkaammin dopaminergisiin hermosoluihin. 6-OHDA on hyvin herkästi hapettava yhdiste ja tämän vuoksi sen käsittelyyn kiinnitettiin erityistä huomiota: 6-OHDA-liuos (4 µg/µl) valmistettiin juuri ennen käyttöä ja säilytettiin valolta suojattuna jäähauteessa. Liuottimena käytettiin 0,02 % askorbiinihappoa sisältävää antioksidanttiliuosta ja samaa 6-OHDA-liuosta käytettiin ainoastaan 2-3 rotan leikkauksessa. Liuoksen väri tarkastettiin aina ennen käyttöä ja mikrolitraruisku täytettiin liuoksella vasta ennen käyttöä. 6-OHDA:n annos jokaiselle rotalle oli 16 µg ja injektio-tilavuus ja -nopeus olivat 4 µl ja 0,75 µl/min.

8.5 Pyörimiskoe

D-amfetamiinilla indusoidut pyörimiskokeet suoritettiin 2, 4 ja 6 viikkoa leikkausten jälkeen Farmakologian ja toksikologian osaston rotometrillä (Roto-Rat mittausrumpu ja Roto-Rat v.2.0.0 ohjelmisto, Med Associates Inc, St. Albans, Virginia, Yhdysvallat). Roto-Rat laitteisto rekisteröi rotalle puettuihin valjaisiin kiinnitetyn jousen avulla rotan pyörimän kiertokulman, jonka ohjelmisto muuttaa myötä- tai vastapäivään pyörimiseksi täys- (360°) tai osittaiskiertoiksi (22,5°). Ohjelmisto asetettiin tunnistamaan 45° käännös pyörimissuuntaa vastakkaiseen suuntaan pyörimissuunnan vaihdokseksi. Tällöin rotan pään heiluttaminen ja muu epäolennainen liikehdintä ei vaikuta mittaustulokseen.

Kokeen alussa rotat puettiin valjaisiin ja asetettiin noin puolen tunnin ajaksi totuttautumaan sylinterin mallisiin, puupuraa sisältäviin, puolipallonmuotoisiin pyörimisrumpuihin. Tämän mallisten rumpujen on todettu häiritsevän eläinten pyörimistä tasapohjaisia rumpuja vähemmän ja tuottavan tasaisemman pyörimisnopeuden hidastumisen D-amfetamiinin vaikutuksen heikentyessä (Ungerstedt ja Arbuthnott 1970). Tämän jälkeen 2,5 mg/kg D-amfetamiinia injisoitiin rottien vatsaonteloon, rotat kiinnitettiin valjaista rotometrin jouseen ja pyörimiskäyttäytymistä mitattiin 120 minuutin ajan. Täys- ja osittaiskierrokset rekisteröitiin 5 minuutin intervalleissa. Tulosten käsittelyä varten 120 minuutin aikana pyörityt täyskierrokset muunnettiin nettoipsilateraalisiksi kierroksiksi vähentämällä kontralateraalisesti pyörityt täyskierrokset ipsilateraalisista täyskierroksista.

8.6 Perfusointi

Rottien transkardiaalinen perfusointi ja aivojen poistaminen suoritettiin pyörimiskokeiden päätyttyä, 7 viikkoa leikkausten jälkeen. Perfusointiin käytettiin Watson-Marlown perfuusiopumppua (malli: Sci-Q 323, Wilmington, Massachusetts, Yhdysvallat). Perfusoitava rotta nukutettiin injisoimalla 120 mg/kg pentobarbitaalia vatsaonteloon. Tajunnan taso arvioitiin varvasrefleksin ja häntärefleksin katoamista seuraamalla ja tarvittaessa rotalle annettiin n. 60 mg/kg lisäannos pentobarbitaalia. Refleksien täydellisen katoamisen jälkeen rotta asetettiin jäillä täytettyyn vatiin ja sen rintaontelo avattiin sydämen paljastamiseksi. Perfuusiopumppuun kiinnitetty 18 G:n neula vietiin sydämen vasempaan kammioon ja oikea eteinen puhkaistiin. Perfuusio aloitettiin 5 minuutin PBS-perfuusiolla jota seurasi 10 minuutin perfuusio 4 %:n paraformaldehydillä. Paraformaldehydi sitoo kudoksen komponentteja yhteen, mikä tekee kudoksesta mekaanisesti kestävämmän ja auttaa kudismorfologian säilymisessä kudosta käsiteltäessä (Berod ym. 1981). Hyvin onnistunut perfuusio helpottaa seuraavien vaiheiden, immunohistokemian ja solulaskennan suorittamista merkittävästi. Perfuusion etenemistä seurattiin tarkkailemalla rintaontelon elinten värimuutosta ja verenkierrasta poistuvan perfuusionesteen väriä PBS-perfuusion aikana sekä lihasvärinää ja rotan raajojen jäykkyyttä paraformaldehydi-perfuusion aikana.

Perfusoinnin jälkeen rotan aivot poistettiin ja asetettiin 4 % paraformaldehydi-liuokseen postfiksoitumaan seuraavaan päivään saakka. Tämän jälkeen aivot siirrettiin 20 %:n sukroosiliuokseen kudoksessa olevan veden poistamiseksi. Kun aivot olivat vajonneet sukroosiliuosputken pohjalla, pikkuaivot poistettiin ja isoavot siirrettiin syväjäähäpaka-timeen -80°C:een.

8.7 Immunohistokemia

8.7.1 Aivoleikkeet

Immunohistokemiallista värjäystä varten perfusoidut ja pakastetut aivot leikattiin 40 µm:n koronaalisiksi leikkeiksi Leica CM3050 -kryostaatilla (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Saksa). Tarvittavat aivoalueet, striatum ja SNpc tunnistettiin Paxinosin ja Watsonin (1998) rotan aivoatlaksesta ja alueita edustaviksi keräysväleiksi valittiin leikkeet (+1,60 mm)–(-0,30 mm) ja (-4,30 mm)–(-6,80 mm) bregmasta laskettuna. Kontrollina toimiva aivojen vasen puoli merkittiin injektioneulalla ja leikkeet kerättiin 24-kuoppalevyille siten, että yhteen kuoppaan tuli joka kuudes leike. Leikkeet säilöttiin isotoniseen, jääty-misen estävään PBS-glyseroli-etyleeniglykoliliuokseen ja säilytettiin pakastimessa (-35°C).

8.7.2 TH-värjäys

Dopamiinia syntetisoivat neuronit ja niiden aksonit tunnistettiin aivoleikkeistä TH:n immunohistokemiallisella värjäyksellä käyttämällä avidiini-biotiinikompleksi (ABC) menetelmää. Menetelmässä primaarinen, monoklonaalinen vasta-aine sitoutuu TH:iin ja sekundaarinen, biotinyloitu vasta-aine primaariseen vasta-aineeseen (Su-Ming ym. 1981). Avidiini-biotiinikompleksi, jossa avidiinimolekyyleihin on sitoutunut peroksidaasientsyymeihin konjugoituja biotiinimolekyylejä, sitoutuu puolestaan sekundaarisen vasta-aineen biotiinimolekyyleihin. Siirrettäessä leikkeet vetyperoksidia ja diaminobentsidiiniä (DAB) sisältävään inkubaatioliuokseen biotiiniin konjugoitu peroksidaasientsyymi reagoi H₂O₂:n kanssa ja reaktiotuotteet hapettavat DAB:n.

Hapettunut DAB muodostaa tummanruskean, liukenemattoman sakan, joka värjää tyrosiinihydroksylaasia sisältävät solut mikroskoopilla havaittaviksi ja laskettaviksi.

Värjättävät leikkeet huuhdeltiin ensin PBS:ssa kolme kertaa 10 minuuttia PBS-glyseroli-etyleeniglykoliliuoksen poistamiseksi. Kerralla värjättiin yhden kuoppalevyn kuopan sisältämät leikkeet striatumista ja substantia nigraa eli joka kuudes kerätty leike kummaltakin alueelta. Leikkeissä oleva endogeeninen peroksidaasiaktiivisuus sammutettiin inkuboimalla leikkeitä viiden minuutin ajan metanolivetyperoksidiliuoksessa ja leikkeet pestiin kuten edellä (3*10 min). Tämän jälkeen leikkeet siirrettiin normaalia hevosen seerumia sisältävään esi-inkubaatioliuokseen tunnin ajaksi. Esi-inkubaation tarkoitus on peittää kudoksessa olevia epitoppeja ja estää primaarisen vasta-aineen sitoutuminen muihin proteiineihin kuin TH:iin. Esi-inkubaation jälkeen leikkeet siirrettiin inkuboitumaan primaariseen vasta-aineliuokseen (ks. kappale ”Liuosten valmistus”) 16-20 tunniksi. Sekundaarivasta-ainekontrollileikkeitä inkuboitin primaarivasta-ainetta sisältämättömässä esi-inkubaatioliuoksessa.

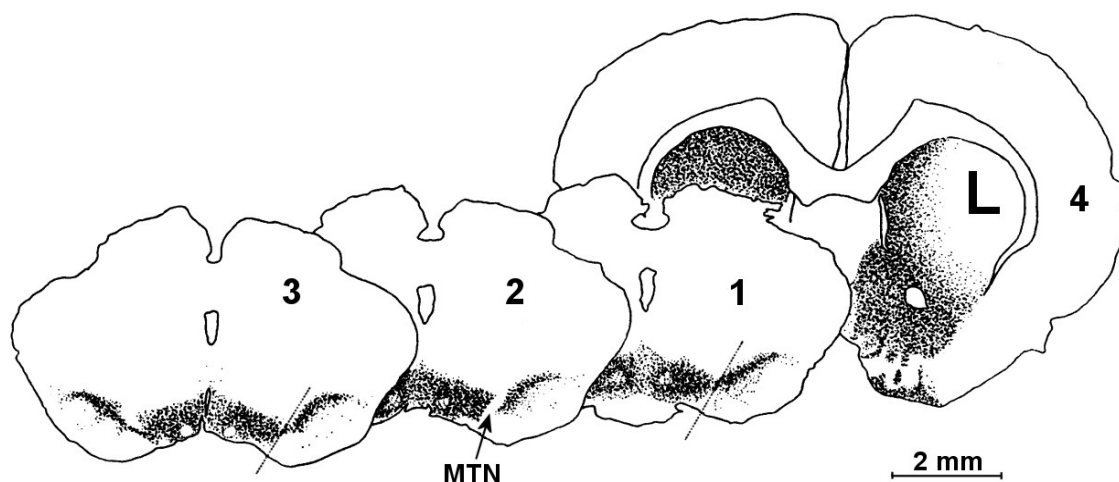
Toisena värjäyspäivänä leikkeet huuhdeltiin PBS:ssa (3*10 min) sitoutumattoman vasta-aineen poistamiseksi ja siirrettiin kahdeksi tunniksi sekundaariseen vasta-aineliuokseen (ks. kappale ”Liuosten valmistus”) inkuboitumaan. Primaarivasta-ainekontrollileikkeitä inkuboitin pelkässä esi-inkubaatioliuoksessa. Tämän jälkeen PBS-huuhtelut toistettiin ja leikkeitä inkuboitin tunnin ajan ABC-liuoksessa. Tätä vaihetta seurasi vielä viimeinen PBS-pesuserja ja lyhyt inkubaatio DAB-liuoksessa. DAB-reaktio suoritettiin pimeässä vetokaapissa. Substantia nigra -leikkeitä inkuboitin DAB-liuoksessa kolmekymmentä ja striatum-leikkeitä 45 sekuntia. Leikkeet pestiin pikaisesti PBS:ssa 2 kertaa heti inkubaation jälkeen ja siirrettiin mikroskooppilaseille. Mikäli leikkeet siirrettiin laselle vasta seuraavana päivänä, pestiin leikkeet kolmesti ja säilytettiin jääkaapissa siirtämiseen saakka.

Leikkeiden annettiin kuivua mikroskooppilaseilla yön yli, jonka jälkeen fosfaattipuskurin jättämät kiteet poistettiin huuhtelemalla lasia milliQ-vedessä. Leikkeisiin jäänyt vesi poistettiin huuhtamalla objektilaseja nousevissa

etanolipitoisuuksissa (viimeinen etanoli-pitoisuus oli 99 % v/v) sekä ksyleenissä ja peitinlasit kiinnitettiin objektilasien päälle ksyleeni-pohjaisella Pertexillä®.

8.7.3 Solulaskenta

Tyrosiinihydroksylaasia sisältävien solujen määrä laskettiin SNpc:sta Sauerin ja kumppanien (1995) artikkelissaan kuvaamaa tapaa mukaillen: koko *pars compactan* solumäärä arvioitiin laskemalla kolmen leikkeen solumäärä. Keskimmäisestä leikkeestä täytyi olla nähtävissä mediaalinen terminaalinen tumake ja rostraaliseksi sekä kaudaaliseksi leikkeeksi valittiin keskimmäistä edeltänyt ja seurannut leike (kuva 5.). Leikkeet valittiin silmämääräisesti tarkastelemalla, Paxinosin ja Watsonin aivoatlasta (1998) apuna käyttäen. Leikkeiden keräystavasta johtuen valittujen leikkeiden välimatka oli 240 µm. Solut laskettiin 56 rotan leikkeistä.



Kuva 5: Rotan SNpc- ja striatum-leikkeet. Leikkeistä voidaan nähdä TH-IR solujen jakauma ja 6-OHDA-leesio (L) striatumissa (4). SNpc:n TH-IR solut laskettiin leikkeestä, jossa mediaalinen terminaalinen tumake (MTN) oli nähtävissä (2), sekä tästä leikkeestä katsoen rostraalisesta (1) sekä kaudalisesta (3) leikkeestä. Laskettu alue on MTN:sta tai kuvaan piirretyistä viivoista katsoen lateraalinen TH-IR alue. Kuva on artikkelista Sauer ym. 1995.

Solujen laskenta suoritettiin Olympus BX51 -konfokaalimikroskoopilla käyttämällä Stereo Investigator 6.02.2 -ohjelmaa (MicroBrightField Bioscience Inc, Williston, Vermont, Yhdysvallat). Laskenta oli osittain sokkoutettu, koska laskija ei ollut tietoinen siitä minkä käsittelyn kukin laskettavista aivoista oli saanut. Laskettava alue rajattiin 4x

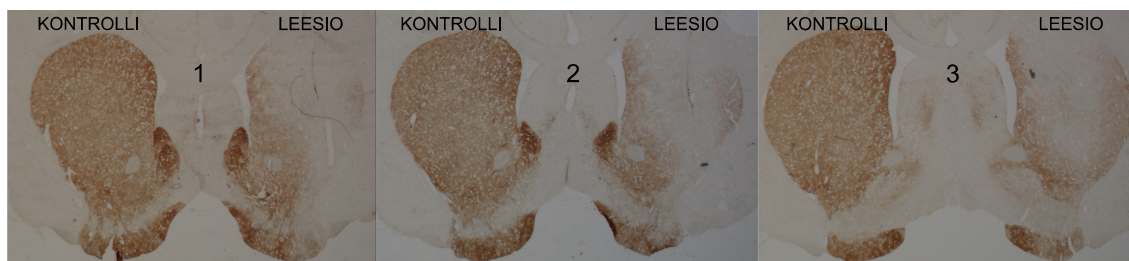
suurennoksella ja värjäytyneet solut laskettiin 60x suurennoksella. Laskentaan käytettiin ns. optista fraktiointia, jossa optinen dissektori eli kyky laskea soluja tietyltä syvyysväliltä leikkeen sisältä yhdistyy systemaattiseen, tasaväliseen satunnaisotantaan (engl. uniform random sampling) (West ym. 1991). Tämä laskentatapa on suhteellisen harhaton ja tuottaa tarkan arvion solumäärästä jo melko pienillä otannoilla.

Solulaskennassa käytettyjen laskentaruutujen koko oli 60x60 μm ja ristikon, johon laskentaruudut sijoituivat, koko oli 125x125 μm (otannan osuus koko ristikon pinta-alasta oli 23 %). Solut laskettiin 20 μm :n syvyydeltä alueelta. Mikroskooppi tarkennettiin jokaisen laskentaruudun kohdalla leikkeen pintaan ja laskeminen aloitettiin 5 μm pinnan alapuolelta. SNpc:n koko solumäärä oli kaikkien kolmen leikkeen solumäärien summa kerrottuna leikkeiden otantavälillä eli kuudella. Solulaskennan luotettavuuden ja toistettavuuden arvioinnissa käytettiin apuna Schaefferin virhekerrointa: kertoimen arvoa 0,15 pidettiin riittävänä. Leikkeet, joiden virhekerroin ylitti tämän arvon, joko laskettiin uudelleen tai värjättiin uudelleen. Tuloksissa SNpc:n solumäärä on ilmoitettu leesioidun aivopuolen ja kontrollipuolen solumäärien suhteena.

8.7.4 Optinen tiheys

Striatumin optisen tiheyden (OD) määrittämiseen valittiin kolme injektiokohtaa hyvin edustavaa, TH-värjättyä leikettä (kuva 6.). Striatum-leikkeitä kerättiin yhteensä 57 rotalta ja kaikki leikkeet kuvattiin Nikon C-FMC mikroskoopilla ja BS-Fi1 kameralla (Nikon Corporation, Tokio, Japani) käyttämällä samoja asetuksia (sama valotusaika, valkotasopaino ym.). OD määritettiin kuvista Image Pro Plus ohjelmalla (Media Cybernetics Inc, Bethesda, Maryland, Yhdysvallat). Kuva muunnettiin mustavalkoiseksi ja värit käännettiin päinvastaiseksi, jolloin tumman ruskeaksi värjäytynyt, terve striatum nähtiin kuvissa vaalean harmaana tai valkoisena ja leesioitu striatum tumman harmaana. Tämän jälkeen terveen ja leesioidun striatumin värin kirkkausaste mitattiin kuvista viivatyökalulla piirtämällä viiva kaudaaliseen dorsaaliseen striatumiin. Viivan päätepisteet valittiin niin, että syntynyt viiva edusti mahdollisimman hyvin kulloinkin syntynyttä leesiokuviota. Tausta-arvoa varten kirkkausaste mitattiin myös aivokuorelta, jossa tyrosiinihydroksylaasivärjäytymistä ei esiinny. Tulokset on ilmoitettu leesiopuolen

keskikirkkausasteena suhteutettuna kontrollipuolen kirkkausasteeseen. Tausta on vähennetty molemmista arvoista ennen laskuja.



Kuva 6: Optisen tiheyden määrittämiseen käytetyt striatum-leikkeet. Kuvan aivoleikkeet ovat saliini-ryhmän hiiren TH-värjättyjä leikkeitä. Leikkeet on numeroitu rostraalisesta kaudaaliseen (1-3).

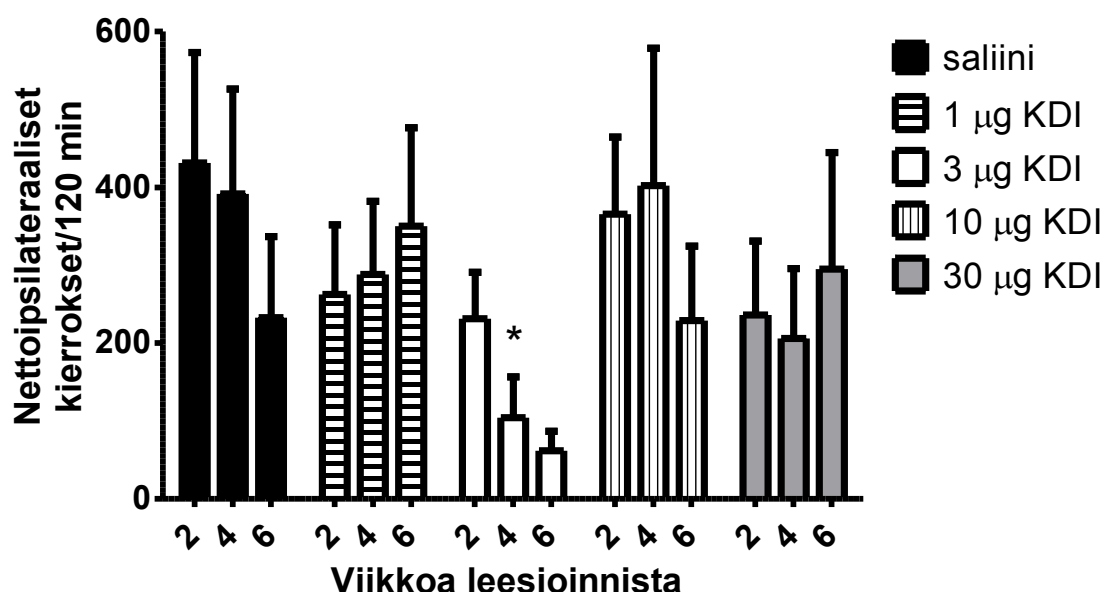
8.8 Tilastollinen analyysi

Kaikkien tulosten tilastolliseen analysointiin käytettiin ensisijaisesti yksisuuntaista varianssianalyysia ja jatkotestinä Tukeyn testiä, kun $p < 0,05$. Paikoin eroja etsittiin myös parittomalla T-testillä. Tilastolliset analyysit suoritettiin Prism v5.02 -ohjelmistolla (GraphPad Software Inc, La Jolla, Kalifornia, Yhdysvallat) ja aineiston hallintaan käytettiin Microsoft Excel 2002 -ohjelmaa (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Yhdysvallat). Kaikki keskiluvut ovat keskiarvoja ja hajontaluvut keskiarvon keskivirheitä (SEM) mikäli toisin ei ole mainittu.

9 TULOKSET

9.1 Amfetamiinilla indusoitu pyörimiskäyttäytyminen

D-amfetamiinilla indusoitua pyörimiskäyttäymistä tutkittiin Wistar-kannan urosroilla 2, 4 ja 6 viikkoa stereotaktisten leikkausten jälkeen. Viikolla kaksi 120 minuutin ajalta mitattujen nettoipsilateraalisten kierrosten määrä saliiniryhmässä oli 431 ± 141 (keskiarvo \pm SEM). KDI-ryhmissä pyöriminen oli vähäisempää, mutta lineaarista annos-vastetta ei ollut havaittavissa. Hajonta kaikissa ryhmissä oli korkeaa ja tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien väliltä ei löytynyt yksisuuntaisella varianssianalyysillä. Vähiten kierroksia mitattiin 3 μ g KDI-peptidiä saaneiden ryhmässä: 231 ± 60 . Kaikki pyörimiskokeiden tulokset on koottu kuvaan 7. ja taulukkoon 3.



Kuva 7: Wistar-kannan urosrottien D-amfetamiinilla (2,5 mg/kg i.p.) indusoitu pyöräminen 2, 4 ja 6 viikkoa leikkausten jälkeen (KDI-tripeptidi/saliini + 16 µg 6-OHDA 6 tunnin välein striatumiin). Kuvaajan arvot ovat 120 minuutin aikana mitattujen nettoipsilateraalisten kierrosten keskiarvo±SEM. 3 µg KDI-ryhmässä n=17, 1, 10 ja 30 µg KDI-ryhmissä n=8-9 ja saliini-ryhmässä n=15. *ryhmän tulos eroaa saliini-ryhmästä p<0,05 parittomalla T-testillä.

Neljä viikkoa leikkausten jälkeen muuttui pyöräiskäyttäytyminen merkittävästi vain 3 µg KDI-ryhmässä laskien 104±53 kierrokseen. Varianssianalyysin voima oli riittämätön havaitsemaan eroja ryhmien välillä mutta parittomassa T-testissä 3 µg KDI-ryhmän pyöräimien nettoipsilateraalisten kierrosten keskiarvo oli merkitsevästi (p<0,05) pienempi kuin saliini-ryhmän.

Kuudennella mittausviikolla 3 µg KDI-ryhmän tulos laski edelleen 62±25 kierrokseen. Saliini-ryhmän tulos laski 233±104 kierrokseen ja 10 µg KDI-ryhmän tulos 229±96 kierrokseen. 1 tai 30 µg KDI-peptidiä saaneiden ryhmässä pyöräminen kasvoi kuudennella mittausviikolla: Nettoipsilateraaliset kierrokset 1 µg KDI-ryhmässä olivat 350±126 ja 30 µg KDI-ryhmässä 295±149. Ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja.

Taulukko 3: Nettoipsilateraalisten kierrosten keskiarvo \pm SEM 120 minuutin D-amfetamiinilla (2,5 mg/kg i.p.) indusoiduissa pyörimiskokeissa 2, 4 ja 6 viikkoa stereotaktisten leikkausten jälkeen (KDI/saliini + 16 μ g 6-OHDA 6 tunnin välein striatumiin).

Käsittelyryhmä	Otoksen koko	2 viikkoa leikkauksesta	4 viikkoa leikkauksesta	6 viikkoa leikkauksesta
saliini	n=14-15	431,33 \pm 141,49	391,67 \pm 134,65	232,64 \pm 104,06
1 μ g KDI	n=8	262,50 \pm 89,02	288,00 \pm 93,83	350,13 \pm 126,36
3 μ g KDI	n=17	231,24 \pm 59,50	104,00 \pm 52,79	61,94 \pm 24,83
10 μ g KDI	n=9	365,44 \pm 99,03	402,00 \pm 176,51	228,67 \pm 95,80
30 μ g KDI	n=8	236,00 \pm 94,90	206,00 \pm 89,63	295,00 \pm 149,48

Ryhmiä korkea sisäistä hajontaa hallitakseni kokeilin tulosten analysointia poistamalla pyörimistuloksista kaikki havainnot, jotka olivat pienempiä kuin keskiarvo-2*SD tai suurempia kuin keskiarvo+2*SD. Tällaisia arvoja oli kaikkien mittausviikkojen materiaalissa yhteensä 10 ja yhdessä ryhmässä samalla mittausviikolla korkeintaan kaksi. Näin käsitellyissä tuloksissa 3 μ g KDI-ryhmän kuudennella mittausviikolla pyörimät kierrokset laskivat 61,94 \pm 24,83 kierroksesta 39 \pm 11 kierrokseen ja saliini-ryhmän 295,00 \pm 149,48 kierroksesta 141 \pm 53 kierrokseen. Ero oli parittomassa T-testissä merkitsevä ($p<0,05$).

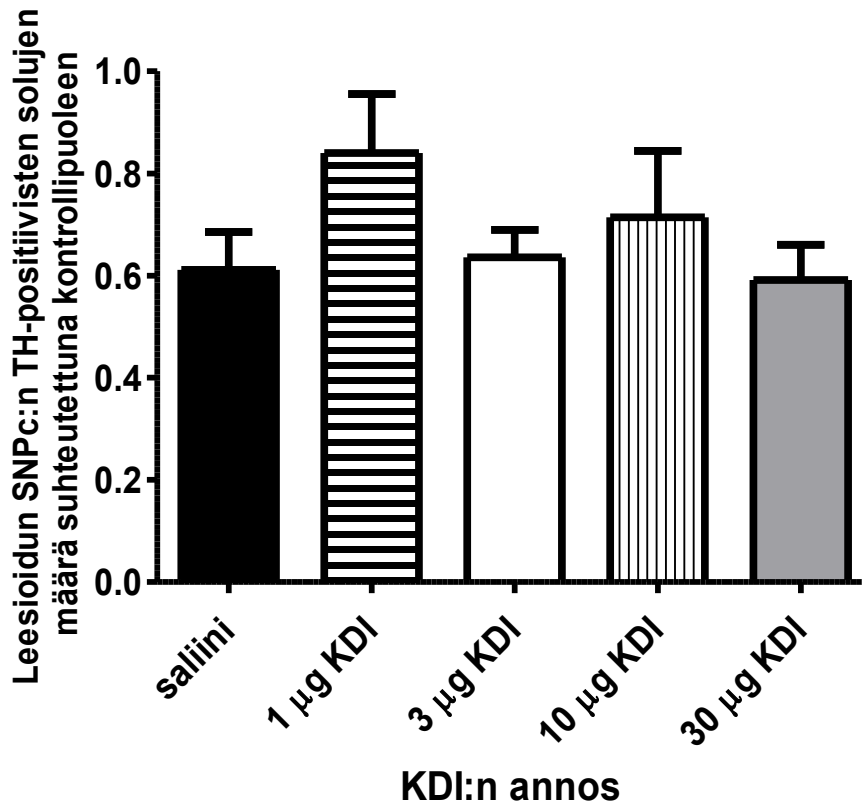
9.2 Tyrosiinihydroksylaasia ekspressoivien solujen määrä substantia nigra *pars compactassa*

Tyrosiinihydroksylaasia sisältävien solujen määrä SNpc:ssä määritettiin laskemalla kolmen, keskeisen leikkeen solumäärä. Solulaskennassa suureksi ongelmaksi nousi leikkeiden värjäysongelma, jonka seurauksena useiden aivojen kontrollipuolen SNpc:n laskettu solumäärä oli jopa yli 50 % tavanomaista solumäärää alhaisempi. Ongelma ei kuitenkaan vaikuttanut leesiopuolen laskettuihin solumääriin ja näin ollen vääristi tuloksia merkittävästi. Ongelmalliset aivot olivat mikroskoopilla helposti tunnistettavissa ja niiden laskentatuloksia ei ole otettu mukaan tässä esitettäviin tuloksiin. Suurin osa näistä aivoista oli peräisin jälkimmäisen, NP2-saapumiserän rotilta

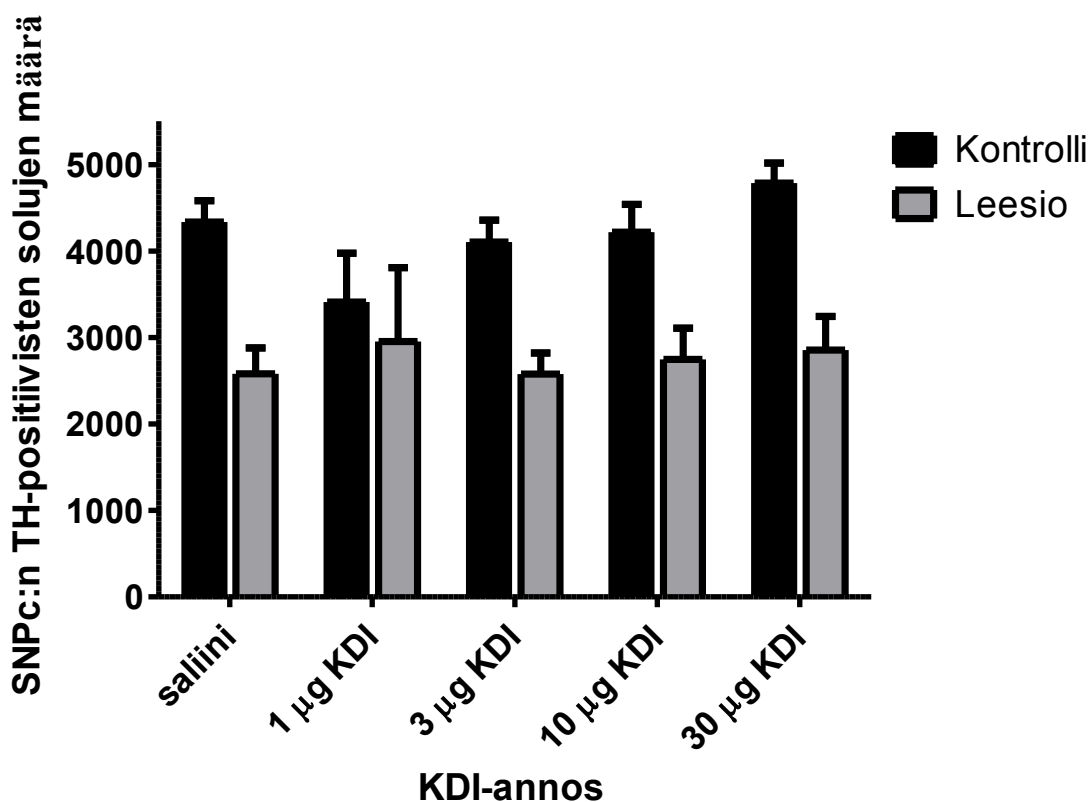
(ks. taulukko 2.). Ongelma vaikutti voimakkaimmin 1 µg KDI-ryhmän laskentatuloksiin, sillä 1 µg:n annosta ei tutkittu NP1-saapumiserän rotilla.

Saliini-ryhmässä (n=10) leesiopuolen TH-positiivisten solujen määrä oli $61,1 \pm 7,4$ % kontrollipuolen solumäärästä (kuva 8.). 3 µg KDI-ryhmässä (n=13) vastaava lukema oli $63,6 \pm 5,4$ % ja 30 µg KDI-ryhmässä (n=8) $59,3 \pm 6,9$ %. Tehokkaimmin solut olivat säilyneet 10 µg KDI-peptidiä saaneiden ryhmässä (n=8), jossa leesiopuolen solujen määrä oli $71,1 \pm 13,0$ % kontrollipuolen solumäärästä. 1 µg KDI-ryhmässä SNpc:n soluista olivat säilyneet $84,1 \pm 11,6$ % mutta otoskoko supistui tulosten karsimisen jälkeen kolmeen eikä tarjoa luotettavaa vertailukohtaa. Ryhmien väliltä ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää eroa yksisuuntaisella varianssianalyysillä. Primaari- ja sekundaari-vasta-aineiden kontrollileikkeissä ei ollut havaittavissa värjäytymistä yhtenäkkään värjäyskertana.

Absoluuttinen TH-IR solujen määrä saliini-ryhmän kontrolliaivopuolen SNpc:ssa oli 4336 ± 244 ja leesiopuolen SNpc:ssa 2578 ± 301 (kuva 9.). Leesiopuolen solumäärä erosi merkitsevästi ($p=0,0003$) kontrollipuolen solumäärästä, joten leesioinnin voidaan olettaa onnistuneen. TH-IR solujen määrä 3 µg KDI-ryhmässä oli 4108 ± 249 kontrollipuolella ja 2575 ± 246 leesiopuolella ja 10 µg KDI-ryhmässä 4219 ± 322 kontrollipuolella ja 2749 ± 257 leesiopuolella. 30 µg KDI-ryhmässä TH-positiivisia soluja laskettiin olevan 4785 ± 232 kontrollipuolella ja 2856 ± 389 leesiopuolella ja 1 µg KDI-ryhmässä (n=3) 3411 ± 564 kontrollipuolella ja 2956 ± 854 .



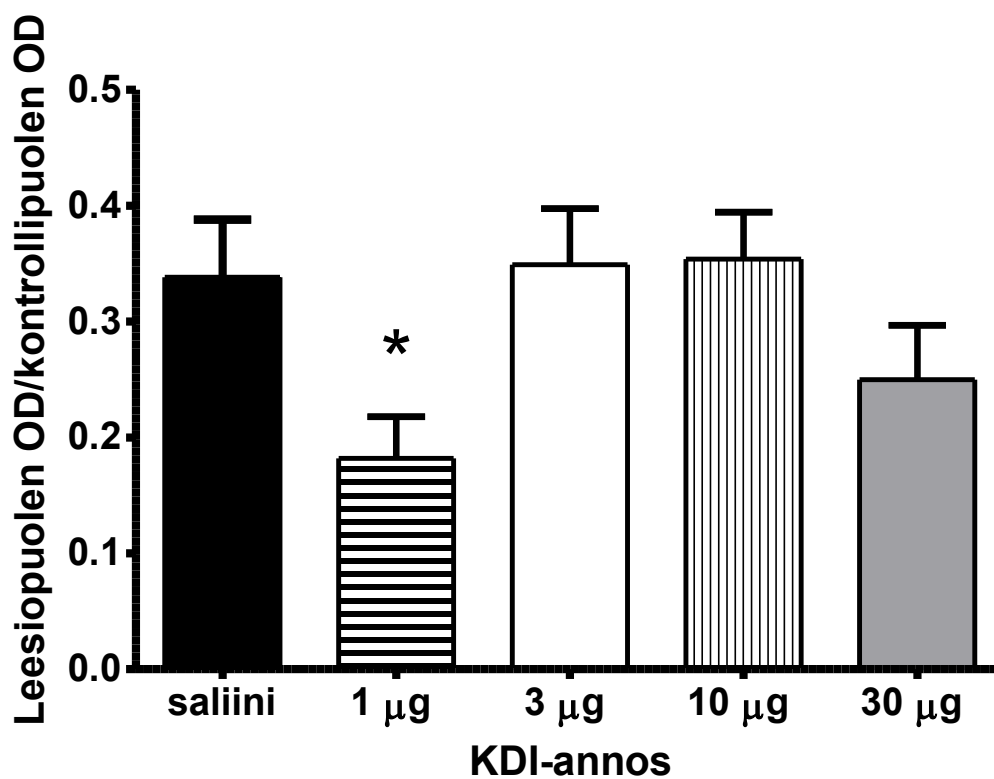
Kuva 8: KDI-tripeptidin vaikutus 6-OHDA:lla leesioidutujen Wistar-rottien SNpc:n TH-IR solujen määrään. KDI ja 6-OHDA injisoitiin 6 tunnin väliajoin oikeaan striatumiin ja aivoleikkeet värjättiin 7 viikkoa tämän jälkeen. TH-IR solujen määrä kuvaajassa on ilmoitettu leesioidun aivopuoliskon SNpc:n solumääränä suhteutettuna kontrollipuolen solumäärään \pm SEM. $n=3$ 1 µg KDI-ryhmässä, $n=13$ 3 µg KDI-ryhmässä, $n=8$ 10 µg KDI-ryhmässä, $n=8$ 30 µg KDI-ryhmässä ja $n=10$ saliini-ryhmässä. Tulokset eivät eronneet toisistaan yksisuuntaisessa varianssianalyysissä.



Kuva 9: KDI-tripeptidin vaikutus 6-OHDA:lla leesioitujen Wistar-rottien SNpc:n TH-IR solujen määrään. KDI ja 6-OHDA injisoitiin 6 tunnin väliajoin oikeaan striatumiin ja aivoleikkeet värjättiin 7 viikkoa tämän jälkeen. TH-IR solujen määrä kuvaajassa on ilmoitettu erikseen leesioituneen ja terveen aivopuolen solumäärinä. $n=3$ 1 µg KDI-ryhmässä, $n=13$ 3 µg KDI-ryhmässä, $n=8$ 10 µg KDI-ryhmässä, $n=8$ 30 µg KDI-ryhmässä ja $n=10$ saliini-ryhmässä.

9.3 Striatumin optinen tiheys

Striatumiin saapuvien dopaminergisten aksonien tiheys määritettiin TH-värjätyistä leikkeistä otetuista valokuvista Image Pro Plus -kuvankäsittelyohjelmalla. OD on annettu leesio- ja kontrollipuolen OD:n suhteena. Saliini-ryhmässä ($n=15$) OD:n keskiarvo oli $33,8 \pm 5,0$ % ja 1 µg:n KDI-ryhmässä ($n=8$) $18,2 \pm 3,6$ % (kuva 10.). 3 µg:n KDI-ryhmässä ($n=17$) OD:n arvoksi saatiin $34,9 \pm 4,8$ %, 10 µg:n KDI-ryhmässä ($n=9$) $35,4 \pm 4,0$ % ja 30 µg:n KDI-ryhmässä ($n=8$) $25,0 \pm 4,7$ %. Käsittelyryhmien OD:t eivät eroa toisistaan yksisuuntaisessa varianssianalysissä, mutta parittomassa T-testissä saliini-ryhmän ja 1 µg KDI-ryhmän välillä on tilastollisesti merkitsevä ero ($p < 0,05$).



Kuva 10: Striatumiin annostellun KDI-tripeptidin vaikutus striatumien OD:een unilateraalisesti 6-OHDA:lla leesioiduilla Wistar-kannan urosrotilla. KDI ja 16 µg:n 6-OHDA injektiot annettiin 6 tunnin välein suoraan striatumiin seitsemän viikkoa ennen aivojen eristämistä ja OD:n määrittämistä. OD mitattiin TH-värjätyistä leikkeistä ja on ilmoitettu kuvaajassa leesio- ja kontrollipuolen OD:ien osamäärien keskiarvona ± SEM. Saliini-ryhmässä n=15, 1 ja 30 µg KDI-ryhmissä n=8, 3 µg KDI-ryhmässä n=17 ja 10 µg KDI-ryhmässä n=9. *ryhmän tulos eroaa saliini-ryhmästä ($p < 0,05$) parittomassaa T-testissä.

10 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA

Tutkin erikoistyössäni γ 1-laminiinin osan, KDI-tripeptidin dopaminergisia hermosoluja suojaavaa vaikutusta 6-OHDA:lla indusoidussa, toispuoleisessa Parkinsonin tauti-mallissa rotilla. KDI-tripeptidi on aikaisemmissa tutkimuksissa osoittautunut tehokkaaksi, hermosolujen selviytymiskykyä ja neuroittien kasvua parantavaksi yhdisteeksi (Wiksten ym. 2004a ja b). Sen on myös osoitettu suojelevan SNpc dopaminergisia hermosoluja SNpc:aan injisoidun 6-OHDA:n toksisilta vaikutuksilta (Väänänen ym. 2006). Näiden tulosten rohkaisemana päätimme tutkia KDI-peptidin

vaikutuksia kasvutekijöiden tutkimukseen yleisimmin käytetyssä intrastriataalisessa 6-OHDA-leesiomallissa. 1-30 µg KDI-peptidiä tai saliniä ja 16 µg 6-OHDA:a injisoitiin tutkimuksessa kuuden tunnin välein rottien striatumiin ja muodostuvan leesio-
 kokoa arvioitiin tutkimalla D-amfetamiinilla indusoitua pyörimiskäyttäytymistä sekä laskemalla TH-IR solujen määrä SNpc:sta ja määrittämällä striatumin optinen tiheys.

10.1 KDI-tripeptidi vähentää amfetamiinilla indusoitua pyörimistä

Kaksi viikkoa leesioinnin jälkeen salini-ryhmän rotat pyörivät keskimäärin 431 ± 141 nettoipsilateraalista täyskierrosta 120 minuutin aikana D-amfetamiinilla (2,5 mg/kg i.p.) indusoidussa pyörimiskokeessa ja leesiointi näytti onnistuneen hyvin. Pyörittyjen kierrosten lukumäärä pysyi lähes samalla tasolla viikolla neljä (392 ± 135 kierrosta) mutta laski voimakkaasti viikolla kuusi 233 ± 104 nettoipsilateraaliseen kierrokseen. Saliini-ryhmän pyörimistulokset olivat Helsingin yliopiston Farmakologian ja toksikologian osastolla aikaisemmin raportoituihin, lähes samalla koeasetelmalla tehtyihin tutkimuksiin verrattuna hyvin samanlaisia: Leskelä (2008) ja Matilainen (2008) käyttivät samaa 6-OHDA-annosta, injektiokoordinaatteja sekä pyörimismallia ja heidän pyörimistuloksensa salini-ryhmissä 2-6 viikkoa 6-OHDA-infusion jälkeen olivat 284-582 ipsilateraalista kierrosta 120 minuutin mittausaikana. Nettoipsilateraalisten kierrosten lukumäärän lasku viikolla kuusi oli odottamaton löydös, sillä kierrosten määrä salini-ryhmässä yleensä joko kasvaa tai pysyy samalla tasolla kuuden viikon mittausaikavälillä (Kirik ym. 2000; Leskelä 2008; Matilainen 2008; Pörsti 2009). Rotilla nigrostriataalisen radan spontaania palautumista on havaittu 16 viikon kuluttua striatumin leesionnista mutta viikolla kuusi SNpc:n solutuho on yhä käynnissä (Sauer ja Oertel 1994). Lisäksi toistuvan D-amfetamiiniannostelun on todettu herkistävän hiiret ja rotat D-amfetamiinin vaikutuksille, jolloin pyörittyjen kierrosten lukumäärässä tulisi havaita kasvua aikaisempiin mittauksiin verrattuna, vaikka leesio-
 koko pysyisi samana (Echols 1977; Robinson 1984). Saliini-ryhmän pyörimiskäyttäytymisen vähentyminen ei kuitenkaan ollut täysin poikkeava löydös, sillä Kirik ja kumppanit (1998) ovat raportoineen vastaavaa.

KDI-peptidiä ennen 6-OHDA:a saaneiden ryhmien ja saliini-ryhmän välillä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja yksisuuntaisella varianssianalyysillä yhtenäkkään mittausviikkona. Kaksi viikkoa leikkausten jälkeen kaikkien KDI-ryhmien nettoipsilateraalisten kierrosten keskiarvot olivat saliini-ryhmään verrattuna hieman pienempiä. Kuusi viikkoa leesioinnista erot saliini-ryhmän ja 1, 10 ja 30 µg:n KDI-ryhmien välillä olivat kuitenkin tasoittuneet. Ainoa ryhmä, joka erosi saliini-ryhmästä oli 3 µg:n KDI-ryhmä. Sen nettoipsilateraalisten kierrosten keskiarvot olivat jokaisella mittausviikolla selkeästi saliini-ryhmän keskiarvoja alhaisempia. Ero oli parhaiten havaittavissa mittausviikolla neljä, jolloin 3 µg:n KDI-ryhmä erosi saliiniryhmästä parittomalla T-testillä ($p < 0,05$). Mittausviikolla kuusi ero katosi johtuen selittämättömästä pudotuksesta saliini-ryhmän pyörimistuloksissa.

Pyörimiskokeen tulosten perusteella näyttäisi, että 3 µg:n KDI-tripeptidiannos vähentää D-amfetamiinilla indusoitua pyörimistä ja auttaa ylläpitämään basaalganglioiden toimintaa 6-OHDA-leesioinnin jälkeen. Vaikka ero saliini-ryhmään oli tilastollisesti merkitsevä vain viikolla 4 ja silloinkin vain käyttämällä liberaalia T-testiä, ero keskiarvoissa oli hyvin selkeä. Pyörimismallissa, niin kuin kaikissa käyttäytymiskokeissa, hajonta on korkeaa ja erojen löytäminen pienillä otoksilla vaikeaa. Erojen löytäminen tässä kokeessa vaikeutti se, että saliini-ryhmässä oli jokaisella pyöritysviikolla useita vähäisesti pyörineitä yksilöitä: esimerkiksi alle 50 kierrosta 120 minuutin aikana pyörineitä rottia oli 2. mittausviikolla viisi, 4. mittausviikolla seitsemän ja 6. mittausviikolla kuusi. Tämä saattoi osittain johtua leikkausten epäonnistumisesta: muodostuneen leesio koko saattoi olla niin pieni, että D-amfetamiinilla indusoidun pyörimismallin herkkyys ei ollut riittävä sen tutkimiseen. Saliini-ryhmän leesiopuolen SNpc:n TH:a sisältävien solujen määrä oli 61 % terveen aivopuoliskon solumäärästä ja D-amfetamiinilla indusoidun pyörinnän on todettu alkavan vasta, kun 30-50 % SNpc:n TH-IR soluista ovat tuhoutuneet (Hefti ym. 1980; Lee ym. 1996). 3 µg:n KDI-ryhmässä rottien pyörimistulokset jakautuivat keskiarvon ympärille hienosti lukuun ottamatta yhtä rottia, jonka pyörimistulokset mittausviikoilla neljä ja kuusi olivat 7-9 kertaa ryhmän keskiarvoa suuremmat. Poistettaessa erittäin

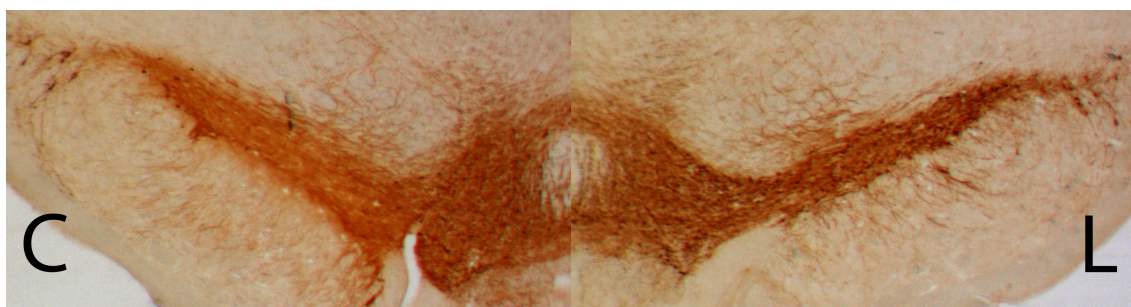
poikkeavat pyörimistulokset aineistosta 3 µg:n KDI-ryhmän keskiarvo erosi saliini-ryhmän keskiarvosta parittomassa T-testissä ($p < 0,05$) myös 6. mittausviikolla.

10.2 KDI-käsittely ei vaikuta substantia nigra *pars compacta*n tyrosiinihydroksylaasia ekspresseoivien solujen määrään

Seitsemän viikkoa leesioidinnin jälkeen saliini-ryhmän SNpc:n TH-IR solujen määrä leesiopuolella oli $61,1 \pm 7,4$ % terveen aivopuoliskon solumäärästä. Tutkimuksessa käytetyn, suhteellisen korkean 16 µg:n 6-OHDA-annoksen huomioon ottaen leesio oli kooltaan melko vaatimaton. Jo 6 tai 8 µg:aa striatumiin injisoitua 6-OHDA:a on aikaisemmissa tutkimuksissa tuhonnut saman verran SNpc:n TH-IR soluja (Lee ym. 1996; Lindholm ym. 2007). Yleisesti käytetty 20 µg:n 6-OHDA-annos tuhoaa 6-8 viikon vaikutusaikana 66-83 % leesiopuolen TH-IR soluista (Saeur ja Oertel 1994; Lee ym. 1996; Aoi ym. 2000; Kirik ym. 2000). Näiden tulosten vastapainoksi Kirik ym. (1998) ja Leskelä (2008) ovat raportoineen saman 6-OHDA-annoksen aiheuttaneen ainoastaan 38-44 %:n solukadon 7-8 viikkoa leesioidinnin jälkeen tutkituissa SNpc-leikkeissä, mikä vastaa omia tuloksiani erittäin hyvin. Kahdessa viimeksi mainitussa tutkimuksessa käytetyt injektioipaikan koordinaatit olivat täysin samat kuin tässä tutkimuksessa käytetyt koordinaatit. Erot injektiopaikassa, -nopeudessa ja -tilavuudessa saattavat vaikuttaa 6-OHDA:n diffuusioon aivokudoksessa ja muodostuvan leesion kokoon. Korkea TH-IR solujen suhteellinen määrä saliini-ryhmässä saattoi heikentää D-amfetamiinilla indusoidun pyörimiskokeen luotettavuutta.

Leesioidun SNpc:n TH-IR solujen suhteelliset määrät KDI-ryhmissä ja saliini-ryhmässä eivät eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi yksisuuntaisessa varianssianalyysissä. Leesiopuolen värjättyjen solujen määrät 10 ja 30 µg KDI-ryhmissä olivat $71,1 \pm 13,0$ ja $59,3 \pm 6,9$ % kontrollipuolen solumäärästä ja vastasivat hyvin kuusi viikkoa leesioidinnin jälkeen mitattuja pyöritystuloksia. Solujen laskentaa häiritsi kiusallinen värjäysongelma, joka kosketi pääasiassa toisen saapumiserän rottien aivoleikkeitä eli saliini-ryhmää sekä 1 ja 3 µg KDI-ryhmiä. Ongelmasta johtuen tilastolliseen analyysiin päätyi 1 µg KDI-ryhmästä vain kolme solulaskentatulosta. Ongelma oli havaittavissa yksinomaan kontrolli-aivopuoliskolla, jossa TH-IR solujen

määrä oli noin 50 % tavanomaista alhaisempi. Silmämääräisesti tarkasteltuna ongelmaleikkeiden kontrollipuolen SNpc näytti normaalilta (kuva 11.): värjäytynyt alue oli kooltaan selvästi suurempi kuin leesiopuolella kaikissa laskettavissa leikkeissä. Jo mikroskoopin nelinkertaisella suurennoksella oli kuitenkin selvästi nähtävissä, että vahvasta taustavärjäytymisestä huolimatta kontrollipuolen TH-IR solut puuttuivat. Vaikka leikkeet, joiden kontrolliaivopuolen värjäytyminen oli epänormaalia, olivat helposti tunnistettavissa mikroskoopilla, saattoi värjäysongelma vääristää solulaskentatuloksia. Värjäysongelman syy on epäselvä mutta saattoi johtua kudosten kiinnitysongelmasta ja solujen aivoleikkeistä irtoamisesta tai hajoamisesta käsittelyn yhteydessä. Koska ongelma esiintyi vain kontrolliaivopuolella, on epätodennäköistä, että 6-OHDA tai KDI-käsittely olisi siihen syyllinen.



Kuva 11: rostraalinen TH-värjätty Snpc-leike, jossa on nähtävissä TH-IR solujen laskentaa hankaloittanut värjäysongelma. Leikkeen kontrolliaivopuolen (C) taustavärjäytyminen on normaalia mutta solut puuttuvat. L=leesioitu aivopuoli.

Pyörimismallissa pyörittyjen kierrosten lukumäärää selvästi vähentänyt 3 μ g KDI-peptidikäsittely ei ennako-odotusten vastaisesti kyennyt säästämään SNpc:n TH-IR soluja, sillä 3 μ g KDI-ryhmän ja saliini-ryhmän solulaskentatulokset olivat lähes identtiset. Näin ollen KDI-tripeptidin pyörimiskäyttäytymistä vähentävä vaikutus ei käytetyssä Parkinsonin tauti-mallissa välttämättä perustu SNpc:n solujen suojelemiseen, vaan välittyä mahdollisesti jonkin muun mekanismin kautta. Saattaa olla, että KDI kompensoi solukadon aiheuttaman dopamiinivajauksen striatumissa kiihdyttämällä dopamiinin synteesiä jäljellä olevissa SNpc:n soluissa tai indusoimalla uusien haarakkeiden kasvua vanhoista aksoneista striatumissa. KDI saattaa myös vaimentaa TH:n ekspressiota, jolloin elossa olevien solujen määrä leesiopuolella vaikuttaisi pienemmältä kuin se tosiasiassa on. TH-ekspression vaimentumista rotilla on todettu esimerkiksi GDNF:n annostelun jälkeen, ja sen uskotaan olevan

takaisinkytkentämekanismi, joka palauttaa GDNF:n tehostamien nigrostriataalisten dopamiinineuronien aktiivisuuden normaalille tasolle (Rosenblad ym. 2003). Teoria, jonka mukaan KDI-peptidi vaimentaa TH-ekspressiota, on kuitenkin ristiriidassa Väänäsen ja kumppanien (2006) tutkimustulosten kanssa: He havaitsivat KDI-käsittelyn pelastavan SNpc:n TH-IR soluja 6-OHDA:n toksiselta vaikutukselta substantia nigraan injisoituna. Erikoistyötutkimuksessani käytetty 6-OHDA-malli erosi kuitenkin Väänäsen ym. (2006) käyttämästä mallista huomattavasti joten saadut tulokset eivät ole suoraan vertailtavissa.

Toinen pyörimiskokeen ja solulaskennan ristiriitaiset tulokset selittävä teoria perustuu KDI-peptidin kykyyn salvata ionotrooppisia AMPA (α -amino-3-hydroksi-5-metyyli-isoksatsoli-4-propionihappo)-, NMDA (N-metyyli-D-aspartaatti)- ja kainaatireseptoreja (Möykkönen ym. 2005). Nigrostriataalisen dopamiiniradan denervaatio PD:ssa tai 6-OHDA-mallissa saa aikaan joukon muutoksia basaalganglioiden toiminnassa mukaan lukien subalamisen tumakkeen (STN) yliaktivoitumisen (Greenamyre 1993). STN:n neuronit ovat glutamatergisia ja projisoivat ihmisillä substantia nigra *pars reticulata*an (SNpr) ja mediaaliseen *globus pallidukseen* (MGP). Nämä ovat basaalganglioiden suurimmat efferentit tumakkeet ja niiden aksonit päättyvät talamuksen ventrolateraaliseseen tumakkeeseen. Koska SNpr:n ja MGP:n neuronit ovat GABAergisia, vähentää STN:n aktivoituminen basaalganglioista talamukseen lähtevien impulssien määrää. Talamuksesta aivokuorelle saapuvan palautteen vähentymisen uskotaan olevan syynä PD:n motorisiin oireisiin. Osoituksena STN:n merkityksestä liikehäiriöiden synnyssä on sen tuhoamisen raportoitu vähentävän huomattavasti 1-metyyli-4-fenyyli-1,2,3,6-tetrahydropyridiinillä (MPTP) käsiteltyjen apinoiden motorisia oireita (Bergman ym. 1990). SNpr:n ja MGP:n neuronien glutamaattireseptorit ovat NMDA- tai AMPA-reseptoreja ja näitä reseptoreja salpaavat yhdisteet saattavat vähentää STN:n liiallisesti aktiivisuudesta johtuvia PD:n oireita.

Glutamaattireseptoriantagonistien vaikutusta unilateraalisessa 6-OHDA-mallissa ei ole tutkittu käyttämällä D-amfetamiinilla indusoitua pyörimismallia, mutta teoriassa niiden pitäisi vähentää pyörimistä parantamalla leesiodun aivopuoliskon basaalganglion

toimintaa ja tasaamalla eroja basaaliganglioiden toimintakyvyssä aivopuoliskojen välillä. Konseptin toimivuudesta on merkinä useita tutkimuksia, joissa NMDA- ja AMPA-antagonistien on todettu toimivan muissa Parkinsonin taudin eläinmalleissa. Klockgether ja Turski (1990) ja Klockgether *et al* (1991) havaitsivat vatsaonteloon injisoitujen, ei-kilpailevan NMDA-antagonisti, MK-801:n ja AMPA-antagonisti, NBQX:n (2,3-dihydroksi-6-nitro-7-sulfamoyyli-bentso[f]kinoksaliini) lisäävän reserpiinillä käsiteltyjen rottien liikeaktiivisuutta ja vähentävän lihasjäykkyyttä. NBQX paransi myös kliiniseen arviointitaulukkoon perustuvassa subjektiivisessa arvioinnissa MPTP:llä käsiteltyjen reesusapinojen motorisia oireita sekä vähensi niiden bradykinesiaa ja lisäsi liikeaktiivisuutta (Klockgether ym. 1991). Lisäksi MK-801, kilpaileva NMDA-antagonisti, CPP (3-[(±)-2-karboksipiperatsin-4-yyli]-propyyli-1-fosfonaatti) ja NBQX tehostivat L-dopan liikeaktiivisuutta lisäävää ja lihasjäykkyyttä vähentävää vaikutusta reserpiinillä käsitellyillä rotilla (Klockgether ja Turski 1990; Klockgether ym. 1991). Vastaavan synergistisen vaikutuksen L-dopan kanssa havaitsivat Löschman *et al* (1991) ja Morelli ja Di Chiara (1990), jotka tutkivat NBQX:n, CPP:n ja MK-801:n vaikutuksia unilateraalisessa 6-OHDA-mallissa rotilla ja MPTP-mallissa marmoseteilla. Yksikään yhdiste ei ollut tehokas yksinään mutta kaikki yhdisteet tehostivat L-dopalla (L-3,4-dihydroksifenyylialaniini) stimuloitua pyörimistä rotilla. NBQX ja CPP lisäsivät myös L-dopan stimuloimaa liikeaktiivisuuden voimistumista marmoseteilla (Löschman ym. 1991).

Uskottavasta tieteellisestä pohjastaan huolimatta teoria, jonka mukaan KDI-peptidi vähentää D-amfetamiinilla indusoitua pyörimistä salpaamalla NMDA- ja AMPA-reseptoreja MGP:ssa ja SNpr:ssa, ei ole täysin ongelmaton. Teorian perusolettamukset täyttääkseen KDI-peptidin tulee joko diffundoitua tai kulkeutua anterogradisesti GABAergisia soluja pitkin striatumista vaikutuskohteisiinsa. AMPA- ja NMDA-antagonistien annostelua striatumiin on kokeiltu aikaisemmin reserpiinillä käsitellyillä rotilla ja tutkitut yhdisteet, NBQX ja CPP havaittiin hyödyttömiksi (Klockgether ja Turski 1990; Klockgether ym. 1991). Annostelu STN:een, entopedunkulaariseen tumakkeeseen (rottien vastine ihmisten MGP:lle) tai SNpr:aan sen sijaan lisäsi rottien liikeaktiivisuutta. Toinen suuri ongelma liittyy KDI:n annostelun ja pyörimiskokeiden

väliseen aikaan. On epätodennäköistä, että KDI-peptidiä esiintyy MGP:ssa tai SNpr:ssa riittävinä pitoisuuksina vielä viikkoja striatumiin annostelun jälkeen. Glutamaattireseptoriantagonistien toimivuudesta D-amfetamiinilla indusoidussa pyörimismallissa ei toistaiseksi ole tutkimusnäyttöä, joten emme varmuudella tiedä, onko niiden vaikutus nähtävissä tässä mallissa. Lisäksi, aikaisemmissa tutkimuksissa käytetyissä PD-malleissa vain osalla NMDA- tai AMPA-antagonisteista on yksinään annosteltuna ollut havaittava liikehäiriöitä lievittävä vaikutus (Klockgether ja Turski 1990; Klockgether ym. 1991; Löschman *et al* 1991). Koska KDI-peptidi salpaa sekä AMPA- että NMDA-reseptoreja, on sen vaikutus kuitenkin mahdollisesti yhteen reseptorityyppiin vaikuttavia antagonisteja tehokkaampi.

SNpc:n dopaminergisten solujen kuolemasta seuraavat muutokset basaalganglioiden glutamatergisessä neurotransmissiossa ovat yksi motoristen oireiden synnylle keskeisistä tapahtumista (Greenamyre 1993). Tämän lisäksi glutamaatti näyttelee tärkeää osaa SNpc:n solukuolemaan johtavissa tapahtumissa. Pelkistynyt 6-OHDA estää mitokondrioiden kompleksi I:n toimintaa ja sen muodostamat happiradikaalit vähentävät mitokondrioiden kalvopotentiaalia (Glinka ja Youdim 1995; Lotharius ym. 1999). Mitokondrioiden toiminnanhäiriöistä seuraa ATP:n tuotannon vähentyminen, Na^+/K^+ -ATPaasin toiminnan heikkeneminen ja solukalvon osittainen depolarisaatio (Pedersen ja Schmidt 2000; Beal ym. 1993). Depolarisaatio nostaa solunsisäistä Ca^{2+} -pitoisuutta poistamalla NMDA-reseptorit tukkivan magnesium-sulun ja lisäämällä jänniteherkkien Ca^{2+} -kanavien avautumisen todennäköisyyttä. Samanaikaisesti Ca^{2+} :n kuljetus soluista heikkenee, kun ATP:sta riippuvaisten Ca^{2+} -kuljetusproteiinien toiminta keskeytyy ja lisääntynyt solunsisäinen Na^+ -pitoisuus heikentää $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -antiportin tehokkuutta.

Mitokondrioiden toiminnan heikentyessä jo fysiologinen glutamaterginen neurotransmissio nostaa solunsisäisen Ca^{2+} -pitoisuuden sytotoksiselle tasolle (Beal ym. 1993). Korkea solunsisäinen Ca^{2+} -pitoisuus saa aikaan peruuttamattomia mitokondrioiden vaurioita ja käynnistää useita solukuolemaan päättyviä prosesseja. Vaikka mitokondrioiden toiminnan heikentäminen on vain yksi 6-OHDA:n monista

sytotoksisista vaikutusmekanismeista, saattaa NMDA-reseptorien salpaaminen KDI-tripeptidillä täydentää sen kasvutekijänkaltaisia ominaisuuksia.

Mitokondrioiden toiminnanhäiriöt eivät ole tunnusomaisia ainoastaan 6-OHDA-mallille. PD:a sairastaneilla potilailla substantia nigran ja striatumien solujen elektroninsiirtoketjun kompleksi I:sen alayksikköjen määrä on vähentynyt ja aktiivisuus heikentynyt (Mizuno ym. 1989; Schapira ym. 1990; Hattori ym. 1993). Lisäksi patogeneesiltään ja oireiltaan erittäin tarkasti PD:a muistuttava MPTP:n indusoima parkinsonismi johtuu MPTP:n aktiivisen metaboliitin, MPP^+ :n (1-metyyli-4-fenyylipyridinium) kompleksi I:stä inhiboivasta vaikutuksesta (Nicklas ym. 1985). MPP^+ :n vaikutus on estettävissä NMDA-antagonistilla (Zuddas ym. 1992). 6-OHDA-mallin ja PD:n yhteiset patologiset mekanismit saattavat tarkoittaa, että molemmat patologiat reagoivat KDI-käsittelyyn samalla tavalla. NMDA-reseptoriantagonismin kautta välittyvän neuroprotektion pitäisi kuitenkin näkyä erona saliini- ja KDI-ryhmien SNpc:n TH-IR solujen määrissä eikä pelkästään D-amfetamiinilla indusoidussa pyörimiskäyttäytymisessä.

10.3 KDI ei suojele striatumien dopaminergisia aksoneja

Solulaskentatulosten tueksi määritimme striatumiin saapuvien dopaminergisten aksonien tiheyden mittaamalla TH-värjättyjen striatum-leikkeiden optisen tiheyden. OD määritettiin kolmesta, vaurioaluetta hyvin edustavasta leikkeestä. Saliini-ryhmässä leesioidun striatumien OD oli $33,8 \pm 5,0$ % kontralateraalisen aivopuolen OD:stä. Eri tutkijoiden OD:n määrittämiseen käyttämät menetelmät poikkeavat usein toisistaan, joten mittaustulosten vertaaminen aikaisempiin tutkimustuloksiin on vaikeaa. Kirik *et al* (1998 ja 2000) ovat kuitenkin raportoineet samalta rostrokaudaaliselta akselilta otettujen leikkeiden OD:ksi 30-40 %. Heidän käyttämänsä 6-OHDA-annos oli 20 μ g, injektiokoordinaatit samat kuin tässä tutkimuksessa ja määritysajankohta 3 tai 6 viikkoa leesioidinnin jälkeen.

3 ja 10 μ g:n KDI-ryhmien striatumien OD oli hyvin samanlainen ja 30 μ g:n KDI-ryhmän hieman alhaisempi ($25,0 \pm 4,7$ %) kuin saliini-ryhmän OD. 1 μ g:n KDI-ryhmässä OD oli

vain $18,2 \pm 3,6$ %. Käsittelyryhmien optiset tiheydet eivät eronneet toisistaan yksisuuntaisessa varianssianalyysissä mutta $1 \mu\text{g:n}$ KDI-ryhmän OD oli merkitsevästi ($p < 0,05$) alhaisempi kuin saliini-ryhmän OD parittomassa T-testissä. Toistaiseksi on epäselvää miksi $1 \mu\text{g:n}$ KDI-käsittely näyttää pahentavan 6-OHDA-leesiota. Substantia nigra -leikkeiden immunohistokemiallisessa värjäyksessä esiintynyttä TH-värjäysongelmaa ei ollut havaittavissa striatum-leikkeissä. Koska SNpc:ssa värjäysongelma oli tunnistettavissa pääasiassa TH-IR hermosolujen soomien puuttumisena, saattoi striatum-leikkeiden värjäysongelma jäädä huomaamatta ja vääristää OD:n määrittämiä. Värjäysongelman, mikäli läsnä striatum-leikkeissä, olisi kuitenkin odotettu nostavan $1 \mu\text{g:n}$ KDI-ryhmän tuloksia, koska substantia nigrassa ongelma rajoittui kontrolliaivopuolelle. Määrittämisestä johtuen optinen tiheys on hyvin herkkä muutoksille kuvien valotuksessa ja leikkeiden inkubointiajassa kromogeeninä käytettyä diaminobentsidiiniä sisältävässä liuoksessa. Mikäli leikkeet olivat käytettyihin kameran asetuksiin nähden liian tummia tai vaaleita, osa kuvien väri-informaatiosta saattoi kadota.

Optisen tiheyden mittaustulokset olivat $3 \mu\text{g:n}$ KDI-ryhmää lukuun ottamatta hyvin samansuuntaisia kuin kuusi viikkoa leesioinnin jälkeen mitatut pyörimistulokset ja solulaskentatulokset. Vaikka $3 \mu\text{g:n}$ KDI-käsittely vähensi D-amfetamiinilla indusoitua pyörintää, se ei näyttäisi säästävän striatumin dopaminergisia aksoneja. Striatumin optisen tiheyden määrittäminen on hyvä työkalu tutkittaessa striatumin säilymistä 6-OHDA ja kasvutekijäkäsittelyiden jälkeen mutta SNpc:sta striatumiin saapuvien dopaminergisten haarakkeiden säilyminen ei näyttäisi olevan ehdoton vaatimus motoristen toimintojen säilymiselle. GDNF:n on osoitettu vähentävän 6-OHDA:lla käsiteltyjen rottien apomorfiinilla indusoitua pyörimistä, vaikka sillä ei ole vaikutusta striatumin TH:n aktiivisuuteen tai dopamiinipitoisuuteen (Lapchak ym. 1997). Vastaava ilmiö on havaittu MPTP:llä käsitellyillä reesusapinoilla, joilla GDNF:n on todettu parantavan motorista suorituskkyä ilman havaittavaa muutosta häntätumakkeen dopamiinipitoisuudessa (Gash ym. 1996). Basaaliganglioiden motorisen silmukan toimintaan osallistuvat dopamiinin lisäksi monet muut välittäjäaineet kuten asetyylikoliini, gamma-aminovoihappo, glutamaatti ja useat neuropeptidit (Parent ja

Hazrati 1995). Näiden yhdisteiden reseptoreihin sitoutuvat tai niiden ekspressioon tai metaboliaan vaikuttavat yhdisteet muokkaavat motorisen silmukan toimintaa ja saattavat lievittää motorisia oireita Parkinsonin taudissa ja PD-malleissa. On mahdollista, että KDI:n vaikutuskohdat ovat jossain muussa kuin dopaminergisessä järjestelmässä. KDI-peptidi saattaa myös vähentää solujen TH-ekspressiota, jolloin striatumin aksonitiheys vaikuttaisi todellista pienemmältä.

11 YHTEENVETO

Tutkin erikoistyössäni γ 1-laminiinin neuriittien kasvua parantavasta domeenista löydetyn KDI-tripeptidin neuroprotektiivisiä vaikutuksia toispuoleisessa, 6-OHDA:lla indusoidussa Parkinsonin tauti -mallissa rotilla. Tutkitut KDI-annokset olivat 1-30 μ g ja KDI injisoitiin striatumiin 6 tuntia ennen 6-OHDA-infuusiota. Tehokkain annostaso oli 3 μ g:aa KDI-peptidiä, joka saliniin verrattuna vähensi merkittävästi rottien D-amfetamiinilla indusoitua pyörimiskäyttäytymistä 4 viikkoa leesioinnin jälkeen. KDI-peptidi ei kuitenkaan säästänyt SNpc:n TH:a ekspressoivia, dopaminergisia neuroneita tai niiden striatumin aksoneja.

Erikoistyön tulokset vahvistavat aikaisempia tuloksia, joiden perusteella KDI-tripeptidi saattaisi olla käyttökelpoinen yhdiste Parkinsonin taudin hoidossa (Väänänen ym. 2006). KDI-peptidin vaikutus erikoistyössä käytetyssä mallissa ei näyttäisi perustuvan SNpc:n dopaminergisten solujen suojelemiseen tai striatumin jäljellä olevien aksonien haarautumisen tehostamiseen, vaan välittyy jonkin muun mekanismin kautta. Koska KDI:n tiedetään salpaavan ionotrooppisia glutamaattireseptoreja, saattaa se parantaa motorista suorituskkyä hillitsemällä Parkinson-oireita pahentavan, yliaktiivisen subtaalamisen tumakkeen toimintaa (Möykkönen ym. 2005). KDI saattaa myös vähentää TH:n ekspressiota, mikä tuottaisi virheellisiä negatiivisia tuloksia käyttämissämme, dopaminergisten neuronien normaalista TH-ekspressiosta riippuvaisissa morfologisissa määrityksissä.

KDI-peptidin vaikutusmekanismit ovat toistaiseksi pääosin tuntemattomia ja niiden selvittäminen on erittäin tärkeää arvioitaessa KDI:n soveltuvuutta Parkinsonin taudin tai

muiden neurodegeneratiivisten sairauksien hoitamiseen. Ensiaskel kohti tätä päämäärää voisi olla KDI:n tyrosiinihydroksylaasin ekspressioon kohdistuvien vaikutusten tutkiminen. Olisi myös kiinnostavaa tutkia, palauttaako KDI-käsittely motorisen suorituskyvyn nigrostriataalisen radan vaurion jo asetuttua.

12 KIRJALLISUUSLUETTELO

Anderson JL, Head SI, Morley JW: Synaptic plasticity in the dy^{2j} mouse model of laminin $\alpha 2$ -deficient congenital muscular dystrophy. *Brain Res* 1042: 23-28, 2005

Anton ES, Kreidberg JA, Rakic P: Distinct Functions of $\alpha 3$ and α_v Integrin Receptors in Neuronal Migration and Laminar Organization of the Cerebral Cortex. *Neuron* 22: 277-289, 1999

Aoi M, Date I, Tomita S, Ohmoto T: GDNF Induces Recovery of the Nigrostriatal Dopaminergic System in the Rat Brain Following Intracerebroventricular or Intraparenchymal Administration. *Acta Neurochir (Wien)* 142: 805-810, 2000

Aumailley M, Battaglia C, Mayer U, Reinhardt D, Nischt R, Timpl R, Fox JW: Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. *Kidney Int* 43: 7-12, 1993

Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JCR, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarraoyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco: A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24: 326-332, 2005

Barlow DP, Green NM, Kurkinen M, Hogan BLM: Sequencing of lamininB chain cDNAs reveals C-terminal regions of coiled-coil alpha-helix. *EMBO J* 3: 2355-2362, 1984

Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC: Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70: 31-46, 1992

Barres BA, Jakobson MD, Schmid R, Sendtner M, Raff MC: Does oligodendrocyte survival depend on axons? *Curr Biol* 3: 489-497, 1993

Barros CS, Franco SJ, Müller U: Extracellular Matrix: Functions in the Nervous System. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a005108, 2011

Battaglia C, Mayer U, Aumailley M, Timpl R: Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *Eur J Biochem* 208: 359-366, 1992

Beal MF, Hyman BT, Koroshetz W: Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci* 16: 125-131, 1993

- Beck K, Dixon TW, Engel J, Parry DAD: Ionic Interactions in the Coiled-coil Domain of Laminin Determine the Specificity of Chain Assembly. *J Mol Biol* 231: 311-323, 1993
- Beltrán-Valero de Bernabé D, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, van Beusekom A, van der Zwaag B, Kayserili H, Merlini L, Chitayat D, Dobyns WB, Cormand B, Lehesjoki A-E, Cruces J, Voit T, Walsh CA, van Bokhoven H, Brunner HG: Mutations in the O-Mannosyltransferase Gene POMT1 Give Rise to the Severe Neuronal Migration Disorder Walker-Warburg Syndrome. *Am J Hum Genet* 71: 1033-1043, 2002
- Belvindrah R, Graus-Porta D, Goebbels S, Nave K-A, Müller U: β 1 Integrins in Radial Glia But Not in Migrating Neurons Are Essential for the Formation of Cell Layers in the Cerebral Cortex. *J Neurosci* 27: 13854-13865, 2007a
- Belvindrah R, Hankel S, Walker J, Patton BL, Müller U: β 1 Integrins Control the Formation of Cell Chains in the Adult Rostral Migratory Stream. *J Neurosci* 27: 2704-2717, 2007b
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR: Reversal of Experimental Parkinsonism by Lesions of the Subthalamic Nucleus. *Science* 249: 1436-1438, 1990
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F: Brain Dopamine and the Syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, Morphological and Neurochemical Correlations. *J Neurol Sci* 20: 415-455, 1973
- Berod A, Hartman BK, Pujol JF: Importance of Fixation in Immunohistochemistry: Use of Formaldehyde Solutions at Variable pH for the Localization of Tyrosine Hydroxylase. *J Histochem Cytochem* 29: 844-850, 1981
- Björklund A, Rosenblad C, Winkler C: Studies on Neuroprotective and Regenerative Effects of GDNF in a Partial Lesion Model of Parkinson's Disease. *Neurobiol Dis* 4: 186-200, 1997
- Blaess S, Graus-Porta D, Belvindrah R, Radakovits R, Pons S, Littlewood-Evans A, Senften M, Guo H, Li Y, Miner JH, Reichardt LF, Müller U: β 1-Integrins Are Critical for Cerebellar Granule Cell Precursor Proliferation. *J Neurosci* 24: 3402-3412, 2004
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M-F, Benabid A-L, Sadoul R, Verna J-M: Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65: 135-172, 2001
- Brädl M, Lassmann H: Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 37-53, 2010

- Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, Martin GR, Meneguzzi G, Paulsson M, Sanes J, Timpl R, Tryggvason K, Yamada Y, Yurchenco PD: A New Nomenclature for the Laminins. *Matrix Biol* 14: 209-211, 1994
- Buttery PC, French-Constant C: Laminin-2/Integrin Interactions Enhance Myelin Membrane Formation by Oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 14: 199-212, 1999
- Calver AR, Hall AC, Yu W-P, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD: Oligodendrocyte Population Dynamics and the Role of PDGF In Vivo. *Neuron* 20: 869-882, 1998
- Canoll PD, Musacchio JM, Hardy R, Reynolds R, Marchionni MA, Salzer JL: GGF/Neuregulin Is a Neuronal Signal That Promotes the Proliferation and Survival and Inhibits the Differentiation of Oligodendrocyte Progenitors. *Neuron* 17: 229-243, 1996
- Carman LS, Gage FH, Shults CW: Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. *Brain Res* 553: 275-283, 1991
- Caro PA, Scavina M, Hoffman E, Pegoraro E, Marks HG: MR Imaging Findings in Children with Merosin-Deficient Congenital Muscular Dystrophy. *AJNR Am J Neuroradiol* 20: 324-326, 1999
- Catterall WA: Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca^{2+} Channels. *Annu Rev Dev Biol* 16: 521-555, 2000
- Champlaud M-F, Lunstrum GP, Rousselle P, Nishiyama T, Keene DR, Burgeson RE: Human Amnion Contains a Novel Laminin Variant, Laminin 7, Which Like Laminin 6, Covalently Associates with Laminin 5 to Promote Stable Epithelial-Stromal Attachment. *J Cell Biol* 132: 1189-1198, 1996
- Chan C-S, Weeber EJ, Kurup S, Sweatt JD, Davis RL: Integrin Requirement for Hippocampal Synaptic Plasticity and Spatial Memory. *J Neurosci* 23: 7107-7116, 2003
- Charonis AS, Tsilibary EC, Saku T, Furthmayr H: Inhibition of Laminin Self-Assembly and Interaction with Type IV Collagen by Antibodies to the Terminal Domain of the Long Arm. *J Cell Biol* 103: 1689-1697, 1986
- Chavis P, Westbrook G: Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* 411: 317-321, 2001
- Chen Z-L, Strickland S: Neuronal Death in the Hippocampus Is Promoted by Plasmin-Catalyzed Degradation of Laminin. *Cell* 91: 917-925, 1997
- Chen Z-L, Indyk JA, Strickland S: The Hippocampal Laminin Matrix Is Dynamic and Critical for Neuronal Survival. *Mol Biol Cell* 14: 2665-2676, 2003

- Chen Z-L, Haegeli V, Yu H, Strickland S: Cortical deficiency of laminin $\gamma 1$ impairs the AKT/GSK-3 β signaling pathway and leads to defects in neurite outgrowth and neuronal migration. *Dev Biol* 327: 158-168, 2009
- Cheng Y-S, Champliand M-F, Burgeson RE, Marinkovich MP, Yurchenco PD: Self-assembly of Laminin Isoforms. *J Biol Chem* 272: 31525-31532, 1997
- Chiocco MJ, Harvey BK, Wang Y, Hoffer BJ: Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 13: 321-328, 2007
- Chun D, Gall CM, Bi X, Lynch G: Evidence that integrins contribute to multiple stages in the consolidation of long term potentiation in rat hippocampus. *Neuroscience* 105: 815-829, 2001
- Chun SJ, Rasband MN, Sidman RL, Habib AA, Vartanian T: Integrin-linked kinase is required for laminin-2-induced oligodendrocyte cell spreading and CNS myelination. *J Cell Biol* 163: 397-408, 2003
- Colognato H, Yurchenco PD: Form and Function: The Laminin Family of Heterotrimers. *Dev Dyn* 218: 213-234, 2000
- Colognato H, MacCarrick M, O'Rear JJ, Yurchenco PD: The Laminin $\alpha 2$ -Chain Short Arm Mediates Cell Adhesion through Both the $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ Integrins. *J Biol Chem* 272: 29330-29336, 1997
- Colognato H, Baron W, Avellana-Adalid V, Relvas JB, Baron-Van Evercooren A, Georges-Labouesse E, ffrench-Constant C: CNS integrins switch growth factor signalling to promote target-dependent survival. *Nat Cell Biol* 4: 833-841, 2002
- Colognato H, Ramachandrappa S, Olsen IM, ffrench-Constant C: Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development. *J Cell Biol* 167: 365-375, 2004
- Colognato H, ffrench-Constant C, Feltri ML: Human diseases reveal novel roles for neural laminins. *Trends Neurosci* 28: 480-486, 2005
- Colognato H, Galvin J, Wang Z, Relucio J, Nguyen T, Harrison D, Yurchenco PD, ffrench-Constant C: Identification of dystroglycan as a second laminin receptor in oligodendrocytes, with a role in myelination. *Development* 134: 1723-1736, 2007
- Colognato-Pyke H, O'Rear JJ, Yamada Y, Carbonetto S, Cheng Y-S, Yurchenco PD: Mapping of Network-forming, Heparin-binding, and $\alpha 1\beta 1$ Integrin-recognition Sites within the α -Chain Short Arm of Laminin-1. *J Biol Chem* 270: 9398-9406, 1995
- Costell M, Gustafsson E, Aszódi A, Mörgelin M, Block W, Hunziker E, Addicks K, Timpl R, Fässler R: Perlecan Maintains the Integrity of Cartilage and Some Basement Membranes. *J Cell Biol* 147: 1109-1122, 1999

Creese I, Snyder SH: Nigrostriatal Lesions Enhance Striatal ^3H -apomorphine and ^3H -spiroperidol Binding. *Eur J Pharmacol* 56: 277-281, 1979

Creese I, Burt DR, Snyder SH: Dopamine Receptor Binding Enhancement Accompanies Lesion-Induced Behavioral Supersensitivity. *Science* 197: 596-598, 1977

Dauer W, Przedborski S: Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 39: 889-909, 2003

De Arcangelis A, Mark M, Kreidberg J, Sorokin L, Georges-Labouesse E: Synergistic activities of $\alpha 3$ and $\alpha 6$ integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. *Development* 126: 3957-3968, 1999

Dean JW, Chandrasekaran S, Tanzer ML: A Biological Role of the Carbohydrate Moieties of Laminin. *J Biol Chem* 265: 12553-12562, 1990

Denzer AJ, Schulthess T, Fauser C, Schumacher B, Kammerer RA, Engel J, Ruegg MA: Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin-1. *EMBO J* 17: 335-343, 1998

Durbeej M: Laminins. *Cell Tissue Res* 339: 259-268, 2010

Echols SD: Circling of Mice Bearing Unilateral Striatal Lesions: Development of Increased Response to D-amphetamine. *Life Sci* 21: 563-568, 1977

Egles C, Claudepierre T, Manglapus MK, Champlaud M-F, Brunken WJ, Hunter DD: Laminins containing the $\beta 2$ chain modulate the precise organization of CNS synapses. *Mol Cell Neurosci* 34: 288-298, 2007

Ehrig K, Leivo I, Argraves WS, Ruoslahti E, Engvall E: Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminin-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3264-3268, 1990

Engvall E, Earwicker D, Haaparanta T, Ruoslahti E, Sanes JR: Distribution and isolation of four laminin variants; tissue restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits. *Cell Regul* 1: 731-740, 1990

Esch T, Lemmon V, Banker G: Local Presentation of Substrate Molecules Directs Axon Specification by Cultured Hippocampal Neurons. *J Neurosci* 19: 6417-6426, 1999

Farwell AP, Dubord-Tomasetti SA: Thyroid Hormone Regulates the Expression of Laminin in the developing Rat Cerebellum. *Endocrinology* 140: 4221-4227, 1999

Feng Y, Walsh CA: Mitotic Spindle Regulation by Nde1 Controls Cerebral Cortical Size. *Neuron* 44: 279-293, 2004

- Fishman RB, Hatten ME: Multiple Receptor Systems Promote CNS Neural Migration. *J Neurosci* 13: 3485-3495, 1993
- Fitzgerald KM, Cibis GW, Giambrone SA, Harris DJ: Retinal Signal Transmission in Duchenne Muscular Dystrophy: Evidence for Dysfunction in the Photoreceptor/Depolarizing Bipolar Cell Pathway. *J Clin Invest* 93: 2425-2430, 1994
- Flanagan LA, Rebaza LM, Derzic S, Schwartz PH, Monuki ES: Regulation of Human Neural Precursor Cells by Laminin and Integrins. *J Neurosci Res* 83: 845-856, 2006
- Forsberg E, Ek B, Engström Å, Johansson S: Purification and Characterization of Integrin $\alpha 9 \beta 1$. *Exp Cell Res* 213: 183-190, 1994
- Fox JW, Mayer U, Nischt R, Aumailley M, Reinhardt D, Wiedemann H, Mann K, Timpl R, Krieg T, Engel J, Chu M-L. Recombinant nidogen consist of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J* 10: 3137-3146, 1991
- Fox MA, Sanes JR, Borza D-B, Eswarakumar VP, Fässler R, Hudson BG, John SWM, Ninomiya Y, Pedchenko V, Pfaff SL, Rheault MN, Sado Y, Segal Y, Werle MJ, Umemori H: Distinct Target-Derived Signals Organize Formation, Maturation, and Maintenance of Motor Nerve Terminals. *Cell* 129: 179-193, 2007
- Franco SJ, Müller U: Extracellular Matrix Functions During Neuronal Migration and Lamination in the Mammalian Central Nervous System. *Develop Neurobiol* 71: 889-900, 2011
- Frost EE, BATTERY PC, Milner R, French-Constant C: Integrins mediate a neuronal survival signal for oligodendrocytes. *Curr Biol* 9: 1251-1254, 1999
- García-Alonso L, Fetter RD, Goodman CS: Genetic analysis of Laminin A in *Drosophila*: extracellular matrix containing laminin A is required for ocellar axon pathfinding. *Development* 122: 2611-2621, 1996
- Garbe JHO, Göhring W, Mann K, Timpl R, Sasaki T: Complete sequence, recombinant analysis and binding to laminins and sulphated ligands of the N-terminal domains of laminin $\alpha 3 \beta$ and $\alpha 5$ chains. *Biochem J* 362: 213-221, 2002
- Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA: Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380: 252-255, 1996
- Gensburger C, Labourdette G, Sensenbrenner M: Influence of meningeal cells on the proliferation and maturation of rat neuroblasts in culture. *Exp Brain Res* 63: 321-330, 1986

- Georges-Labouesse E, Mark M, Messaddeq N, Gansmüller A: Essential role of $\alpha 6$ integrins in cortical and retinal lamination. *Curr Biol* 8: 983-986, 1998
- Gersdorff N, Kohfeldt E, Sasaki T, Timpl R, Miosge N: Laminin $\gamma 3$ Chain Binds to Nidogen and Is Located in Murine Basement Membranes. *J Biol Chem* 280: 22146-22153, 2005
- Giancotti FG, Ruoslahti E: Integrin Signaling. *Science* 285: 1028-1032, 1999
- Gilhuis J, ten Donkelaar HJ, Tanke RB, Vingerhoets DM, Zwarts MJ, Verrips A, Gabreëls FJM: Nonmuscular Involvement in Merosin-Negative Congenital Muscular Dystrophy. *Pediatr Neurol* 26: 30-36, 2002
- Glinka YY, Youdim MBH: Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol* 292: 329-332, 1995
- Goetz AK, Scheffler B, Chen H-X, Wang S, Suslov O, Xiang H, Brüstle O, Roper SN, Steindler DA: Temporally restricted substrate interactions direct fate and specification of neural precursors derived from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11063-11068, 2006
- Gomez TM, Letourneau PC: Filopodia Initiate Choices Made by Sensory Neuron Growth Cones at Laminin/Fibronectin Borders *in vitro*. *J Neurosci* 14: 5959-5972, 1994
- Grady RM, Wozniak DF, Ohlemiller KK, Sanes JR: Cerebellar Synaptic Defects and Abnormal Motor Behavior in Mice Lacking α - and β -Dystrobrevin. *J Neurosci* 26: 2841-2851, 2006
- Graus-Porta D, Blaess S, Sendtgen M, Littlewood-Evans A, Damsky C, Huang Z, Orban P, Klein R, Schittny JC, Müller U: $\beta 1$ -Class Integrins Regulate the Development of Laminae and Folia in the Cerebral and Cerebellar Cortex. *Neuron* 31: 367-379, 2001
- Greenamyre JT: Glutamate-dopamine interactions in the basal ganglia: relationship to Parkinson's disease. *J Neural Transm Gen Sect* 91: 255-269, 1993
- Götz M, Huttner WB: The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 777-788, 2005
- Hackett DA, Smith JL, Schoenwolf GC: Epidermal Ectoderm Is Required for Full Elevation and for Convergence During Bending of the Avian Neural Plate. *Dev Dyn* 210: 397-406, 1997
- Halfter W, Dong S, Yip Y-P, Willem M, Mayer U: A Critical Function of the Pial Basement Membrane in Cortical Histogenesis. *J Neurosci* 22: 6029-6040, 2002
- Hall PE, Lathia JD, Caldwell MA, French-Constant C: Laminin enhances the growth of human neural stem cells in defined culture media. *BMC Neurosci* 9: 71, 2008

- Haltia M, Leivo I, Somer H, Pihko H, Paetau A, Kivelä T, Tarkkanen A, Tomé F, Engvall E, Santavuori P: Muscle-Eye-Brain Disease: A Neuropathological Study. *Ann Neurol* 41: 173-180, 1997
- Hama H, Hara C, Yamaguchi K, Miyawaki A: PKC Signaling Mediates Global Enhancement of Excitatory Synaptogenesis in Neurons Triggered by Local Contact with Astrocytes. *Neuron* 41: 405-415, 2004
- Hartell NA: Parallel fiber plasticity. *Cerebellum* 1: 3-18, 2002
- Hattori N, Ikebe S-I, Tanaka M, Ozawa T, Mizuno Y: Immunohistochemical Studies on Complexes I, II, III, and IV of Mitochondria in Parkinson's Disease. *Adv Neurol* 60: 292-296, 1993
- Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ: Partial Lesions of the Dopaminergic Nigrostriatal System in the Rat Brain: Biochemical Characterization. *Brain Res* 195: 123-137, 1980
- Henry MD, Campbell KP: Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol* 11: 602-607, 1999
- Hirosaki T, Mizushima H, Tsubota Y, Moriyama K, Miyazaki K: Structural Requirement of Carboxyl-terminal Globular Domains of Laminin $\alpha 3$ Chain for Promotion of Rapid Cell Adhesion and Migration by Laminin-5. *J Biol Chem* 275: 22495-22502, 2000
- Hoffman MP, Nomizu M, Roque E, Lee S, Jung DW, Yamada Y, Kleinman HK: Laminin-1 and Laminin-2 G-domain Synthetic Peptides Bind Syndecan-1 and Are Involved in Acinar Formation of a Human Submandibular Gland Cell line. *J Biol Chem* 273: 28633-28641, 1998
- Hopkins JM, Ford-Holevinski TS, McCoy JP, Agranoff BW: Laminin and Optic Nerve Regeneration in the Goldfish. *J Neurosci* 5: 3030-3038, 1985
- Hudson JL, van Horne CG, Strömberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA: Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 626: 167-174, 1993
- Humphries JD, Byron A, Humphries MJ: Integrin ligands. *J Cell Sci* 119: 3901-3903, 2006
- Höpker VH, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M-m, Holt C: Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401: 69-73, 1999
- Ichitani Y, Okamura H, Matsumoto Y, Nagatsu I, Ibata Y: Degeneration of the nigral dopamine neurons after 6-hydroxydopamine injection into the rat striatum. *Brain Res* 549: 350-355, 1991

- Ichitani Y, Okamura H, Nakahara D, Nagatsu I, Ibata Y: Biochemical and Immunocytochemical Changes Induced by Intrastriatal 6-Hydroxydopamine Injection in the Rat Nigrostriatal Dopamine Neuron System: Evidence for Cell Death in the Substantia Nigra. *Exp Neurol* 130: 269-278, 1994
- Ido H, Harada K, Futaki S, Hayashi Y, Nishiuchi R, Natsuka Y, Li S, Wada Y, Combs AC, Ervasti JM, Sekiguchi K: Molecular Dissection of the α -Dystroglycan- and Integrin-binding Sites within the Globular Domain of Human Laminin-10. *J Biol Chem* 279: 10946-10954, 2004
- Ido H, Nakamura A, Kobayashi R, Ito S, Li S, Futaki S, Sekiguchi K: The Requirement of the Glutamic Acid Residue at the Third Position from the Carboxyl Termini of the Laminin γ Chains in Integrin Binding by Laminins. *J Biol Chem* 282: 11144-11154, 2007
- Ido H, Ito S, Taniguchi Y, Hayashi M, Sato-Nishiuchi R, Sanzen N, Hayashi Y, Futaki S, Sekiguchi K: Laminin Isoforms Containing the γ 3 Chain Are Unable to Bind to Integrins due to the Absence of the Glutamic Acid Residue Conserved in the C-terminal Regions of the γ 1 and γ 2 Chains. *J Biol Chem* 283: 28149-28157, 2008
- Indyk JA, Chen ZL, Tsirka SE, Strickland S: Laminin chain expression suggests that laminin-10 is a major isoform in the mouse hippocampus and is degraded by the tissue plasminogen activator/plasmin protease cascade during excitotoxic injury. *Neuroscience* 116: 359-371, 2003
- Jacoby S, Sims RE, Hartell NA: Nitric oxide is required for the induction and heterosynaptic spread of long-term potentiation in rat cerebellar slices. *J Physiol* 535: 825-839, 2001
- Jones SR, Gainetdinov RR, Wightman RM, Caron MG: Mechanisms of Amphetamine Action Revealed in Mice Lacking the Dopamine Transporter. *J Neurosci* 18: 1979-1986, 1998
- Jonsson G: Chemical Neurotoxins as Denervation Tools in Neurobiology. *Ann Rev Neurosci* 3: 169-187, 1980
- Kafitz KW, Greer CA: Role of Laminin in Axonal Extension from Olfactory Receptor Cells. *J Neurobiol* 32: 298-310, 1997
- Kariya Y, Yasuda C, Nakashima Y, Ishida K, Tsubota Y, Miyazaki K: Characterization of Laminin 5B and NH₂-terminal Proteolytic Fragment of Its α 3B Chain. *J Biol Chem* 279: 24774-24784, 2004
- Kearns CM, Cass WA, Smoot K, Kryscio R, Gash DM: GDNF Protection against 6-OHDA: Time dependence and Requirement for Protein Synthesis. *J Neurosci* 17: 7111-7118, 1997

- Kerever A, Schnack J, Vellinga D, Ichikawa N, Moon C, Arikawa-Hirasawa E, Efrid JT, Mercier F: Novel Extracellular Matrix Structures in the Neural Stem Cell Niche Capture the Neurogenic Factor Fibroblast Growth Factor 2 from the Extracellular Milieu. *Stem Cells* 25: 2146-2157, 2007
- Kikkawa Y, Moulson CL, Virtanen I, Miner JH: Identification of the Binding Site for the Lutheran Blood Group Glycoprotein on Laminin $\alpha 5$ through Expression of Chimeric Laminin Chains *in Vivo*. *J Biol Chem* 277: 44864-44869, 2002
- Kirik D, Rosenblad C, Björklund A: Characterization of Behavioral and Neurodegenerative Changes Following Partial Lesions of the Nigrostriatal Dopamine System Induced by Intrastriatal 6 Hydroxydopamine in the Rat. *Exp Neurol* 152: 259-277, 1998
- Kirik D, Rosenblad C, Björklund A: Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the intrastriatal 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic factor. *Eur J Neurosci* 12: 3871-3882, 2000
- Klein C, Krämer E-M, Cardine A-M, Schraven B, Brandt R, Trotter J: Process Outgrowth of Oligodendrocytes Is Promoted by Interaction of Fyn Kinase with the Cytoskeletal Protein Tau. *J Neurosci* 22: 698-707, 2002
- Klockgether T, Turski L: NMDA Antagonists Potentiate Antiparkinsonian Actions of L-Dopa in Monoamine-depleted Rats. *Ann Neurol* 28: 539-546, 1990
- Klockgether T, Turski L, Honoré T, Zhang Z, Gash DM, Kurlan R, Greenamyre JT: The AMPA Receptor Antagonist NBQX Has Antiparkinsonian Effects in Monoamine-depleted Rats and MPTP-treated Monkeys. *Ann Neurol* 30: 717-723, 1991
- Knibbs RN, Perini F, Goldstein IJ: Structure of the Concanavalin A Reactive Oligosaccharides of the Extracellular Matrix Component Laminin. *Biochemistry* 28: 6379-6392, 1989
- Knuesel I, Mastrocola M, Zuellig RA, Bornhauser B, Schaub MC, Fritschy J-M: Altered synaptic clustering of GABA_A receptors in mice lacking dystrophin (*mdx* mice). *Eur J Neurosci* 11: 4457-4462, 1999
- Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, Segawa M, Yoshioka M, Saito K, Osawa M, Hamano K, Sakakihara I, Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T: An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394: 388-392, 1998
- Koch M, Olson PF, Albus A, Jin W, Hunter DD, Brunken WJ, Burgeson RE, Champlaud M-F: Characterization and Expression of the Laminin $\gamma 3$ Chain: A Novel, Non-Basement Membrane-associated, Laminin Chain. *J Cell Biol* 145: 605-617, 1999

Kuhn TB, Schmidt MF, Kater SB: Laminin and Fibronectin Guideposts Signal Sustained but Opposite Effects to Passing Growth Cones. *Neuron* 14: 275-285, 1995

LaMantia A-S (luvun toim.): kappale 21, Early Brain Development ja kappale 22, Construction of Neural Circuits. *Kirjassa Neuroscience*, ss 501-556, 3. painos. Toim. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, McHamara JO, Williams SM, Sinauer Associates, Inc, Massachusetts 2004

Lapchak PA, Miller PJ, Collins F, Jiao S: Glial-cell Line-derived Neurotrophic Factor Attenuates Behavioural Deficits and Regulates Nigrostriatal Dopaminergic and Peptidergic Markers in 6-hydroxydopamine-lesioned adult rats: Comparison of Intraventricular and Intranigral Delivery. *Neuroscience* 78: 61-72, 1997

Lathia JD, Patton B, Eckley DM, Magnus T, Mughal MR, Sasaki T, Caldwell MA, Rao MS, Mattson MP, French-Constant C: Patterns of Laminins and Integrins in the Embryonic Ventricular Zone of the CNS. *J Comp Neurol* 505: 630-643, 2007

Laursen LS, Chan CW, French-Constant C: An Integrin-Contactin Complex Regulates CNS Myelination by Differential Fyn Phosphorylation. *Neuron* 29: 917-918, 2009

Lee CS, Sauer H, Björklund A: Dopaminergic Degeneration and Motor Impairments Following Axon Terminal Lesion by Intrastriatal 6-hydroxydopamine in the Rat. *Neuroscience* 72: 641-653, 1996

Legate KR, Montañez E, Kudlacek O, Fässler R: ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 20-31, 2006

Leskelä O: VEFG-kasvutekijät, niiden reseptorit ja vaikutukset keskushermostossa. Pro gradu, Helsingin yliopisto, Farmasian tiedekunta, Farmakologian ja toksikologian osasto, 2008

Letourneau PC, Madsen AM, Palm SL, Furcht LT: Immunoreactivity for laminin in the developing ventral longitudinal pathway of the brain, *Dev Biol* 125: 135-144, 1988

Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S: Elucidation of the Rate-limiting Step in Norepinephrine Biosynthesis in the Perfused Guinea-pig Heart. *J Pharmacol Exp Ther* 148: 1-8, 1965

LeWitt PA: Levodopa for the Treatment of Parkinson's Disease. *N Engl J Med* 359: 2468-2476, 2008

Libby RT, Lavalley CR, Balkema GW, Brunken WJ, Hunter DD: Disruption of Laminin β 2 Chain Production Causes Alterations in Morphology and Function in the CNS. *J Neurosci* 19: 9399-9411, 1999

- Libby RT, Champliand M-F, Claudepierre T, Xu Y, Gibbons EP, Koch M, Burgeson RE, Hunter DD, Brunken WJ: Laminin Expression in Adult and Developing Retinae: Evidence of Two Novel CNS Laminins. *J Neurosci* 20: 6517-6528, 2000
- Liebkind R, Laatikainen T, Liesi P: Is the Soluble KDI Domain of γ 1 Laminin a Regeneration Factor for the Mammalian Central Nervous System? *J Neurosci Res* 73: 637-643, 2003
- Liesi P: Do Neurons in the vertebrate CNS migrate on laminin? *EMBO J* 4: 1163-1170, 1985a
- Liesi P: Laminin-immunoreactive glia distinguish regenerative adult CNS systems from non-regenerative ones. *EMBO J* 4: 2505-2511, 1985b
- Liesi P, Silver J: Is Astrocyte Laminin Involved in Axon Guidance in the Mammalian CNS? *Dev Biol* 130: 774-785, 1988
- Liesi P, Dahl D, Vaheri A: Neurons Cultured From Developing Rat Brain Attach and Spread Preferentially to Laminin. *J Neurosci Res* 11: 241-251, 1984a
- Liesi P, Kaakkola S, Dahl D, Vaheri A: Laminin is induced in astrocytes of adult brain injury. *EMBO J* 3: 683-686, 1984b
- Liesi P, Närvänen A, Soos J, Sariola H, Snounou G: Identification of a neurite outgrowth-promoting domain of laminin using synthetic peptides. *FEBS Lett* 244: 141-148, 1989
- Liesi P, Seppälä I, Trenkner E: Neuronal Migration in Cerebellar Microcultures Is Inhibited by Antibodies Against a Neurite Outgrowth Domain of Laminin. *J Neurosci Res* 33: 170-176, 1992
- Liesi P, Hager G, Dodt H-U, Seppälä I, Zieglgänsberger: Domain-Specific Antibodies Against the B2 Chain of Laminin Inhibit Neuronal Migration in the Neonatal Rat Cerebellum. *J Neurosci Res* 40: 199-206, 1995
- Liesi P, Fried G, Stewart RR: Neurons and Glial Cells of the Embryonic Human Brain and Spinal Cord Express Multiple and Distinct Isoforms of Laminin. *J Neurosci Res* 64: 144-167, 2001a
- Liesi P, Laatikainen T, Wright JM: Biologically Active Sequence (KDI) Mediates the Neurite Outgrowth Function of the Gamma-1 Chain Of Laminin-1. *J Neurosci Res* 66: 1047-1053, 2001b
- Lindholm P, Voutilainen MH, Laurén J, Peränen J, Leppänen V-M, Andressoo J-O, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK, Saarma M: Novel neurotrophic factor CDFN protects and rescues midbrain dopamine neurons *in vivo*. *Nature* 448: 73-78, 2007

Lindvall O, Björklund A: Cell Therapy in Parkinson's Disease. *NeuroRx* 1: 382-393, 2004

Lissitzky J-CS, Charpin C, Bignon C, Bouzon M, Kopp F, Delori P, Martin P-M. Laminin biosynthesis in the extracellular matrix-producing cell line PFHR9 studied with monoclonal and polyclonal antibodies. *Biochem J* 250: 843-852, 1988

Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL: Distinct Mechanisms Underlie Neurotoxin-Mediated Cell Death in Cultured Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* 15: 1284-1293, 1999

Loulier K, Lathia JD, Marthiens V, Relucio J, Mughal MR, Tang S-C, Coksaygan T, Hall PE, Chigurupati S, Patton B, Colognato H, Rao MS, Mattson MP, Haydar TF, French-Constant C: $\beta 1$ Integrin Maintains Integrity of the Embryonic Neocortical Stem Cell Niche. *PloS Biol* 7: 1-16, 2009

Luckenbill-Edds L: Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res Rev* 23: 1-27, 1997

Löschmann P-A, Lange KW, Kunow M, Rettig K-J, Jähnig P, Honoré T, Turski L, Wachtel H, Jenner P, Marsden CD: Synergism of the AMPA-antagonist NBQX and the NMDA-antagonist CPP with L-Dopa in models of Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect 3*: 203-213, 1991

Ma W, Tavakoli T, Derby E, Serebryakova Y, Rao MS, Mattson MP: Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Dev Biol* 8: 90, 2008

Macdonald PR, Lustig A, Steinmetz MO, Kammerer RA: Laminin chain assembly is regulated by specific coiled-coil interactions. *J Struct Biol* 170: 398-405, 2010

Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP, Fishell G: Sonic Hedgehog Is Required for Progenitor Cell Maintenance in Telencephalic Stem Cell Niches. *Neuron* 39: 937-950, 2003

Manthorpe M, Engvall E, Ruoslahti E, Longo FM, Davis GE, Varon S: Laminin Promotes Neuritic Regeneration from Cultured Peripheral and Central Neurons. *J Cell Biol* 97: 1882-1890, 1983

Marinkovich MP, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE: The Dermal-Epidermal Junction of Human Skin Contains a Novel Laminin Variant. *J Cell Biol* 119: 695-703, 1992

Matilainen T: Transformoivan kasvutekijä beetan (TGF- β) suurperheen hermokasvutekijät. Pro gradu, Helsingin yliopisto, Farmasian tiedekunta, Farmakologian ja toksikologian osasto, 2008

- Matsuzawa M, Weight FF, Potember RS, Liesi P: Directional Neurite Outgrowth and Axonal Differentiation of Embryonic Hippocampal Neurons are Promoted by a Neurite Outgrowth Domain of the B2-chain of Laminin. *Int J Dev Neurosci* 14: 283-295, 1996
- Matsuzawa M, Tokumitsu S, Knoll W, Liesi P: Molecular Gradient Along the Axon Pathway Is Not Required for Directional Axon Growth. *J Neurosci Res* 58: 114-124, 1998
- Mayer U, Nischt R, Pöschl E, Mann K, Fukuda K, Gerl M, Yamada Y, Timpl R: A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding. *EMBO J* 12: 1879-1885, 1993
- McLoon SC, McLoon LK, Palm SL, Furcht LT: Transient Expression of Laminin in the Optic Nerve of the Developing Rat. *J Neurosci* 8: 1981-1990, 1988
- Mehanna R, Jankovic J: Movement disorders in multiple sclerosis and other demyelinating diseases. *J Neurol Sci* 2013 (painossa)
- Ménager C, Arimura N, Fukata Y, Kaibuchi K: PIP₃ is involved in neuronal polarization and axon formation. *J Neurochem* 89: 109-118, 2004
- Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kelley RI, Somer H, Straud V, Mathews KD, Moore SA, Campbell KP: Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418: 417-422, 2002
- Miner JH: Laminins and Their Roles in Mammals. *Microsc Res Tech* 71: 349-356, 2008
- Miner JH, Yurchenco PD: Laminin Functions in Tissue Morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 255-284, 2004
- Miner JH, Patton BL, Lentz SI, Gilbert DJ, Snider WD, Jenkins NA, Copeland NG, Sanes JR: The Laminin α Chains: Expression, Developmental Transitions, and Chromosomal Locations of α 1-5, Identification of Heterotrimeric Laminins 8-11, and Cloning of a Novel α 3 Isoform. *J Cell Biol* 137: 685-701, 1997
- Miner JH, Cunningham J, Sanes JR: Roles for Laminin in Embryogenesis: Exencephaly, Syndactyly, and Placentopathy in Mice Lacking the Laminin α 5 Chain. *J Cell Biol* 143: 1713-1723, 1998
- Miner JH, Li C, Mudd JL, Go G, Sutherland AE: Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 131: 2247-2256, 2004
- Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kafawa Y: Deficiencies in Complex I Subunits of the Respiratory Chain in Parkinson's Disease. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 1450-1455, 1989

- Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD, Dunnett SB: The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods* 36: 219-228, 1991
- Moore SA, Saita F, Chen J, Michele DE, Henry MD, Messing A, Cohn RD, Ross-Barta SE, Westra S, Williamson RA, Hoshi T, Campbell KP: Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature* 418: 422-425, 2002
- Morelli M, Di Chiara G: MK-801 potentiates dopaminergic D₁ but reduces D₂ responses in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol* 182: 611-612, 1990
- Moukhles H, Carbonetto S: Dystroglycan contributes to the formation of multiple dystrophin-like complexes in brain. *J Neurochem* 78: 824-834, 2001
- Murtomäki S, Risteli J, Risteli L, Koivisto U-M, Johansson S, Liesi P: Laminin and Its Neurite Outgrowth-Promoting Domain in the Brain in Alzheimer's Disease and Down's Syndrome Patients. *J Neurosci Res* 32: 261-273, 1992
- Möykkynen T, Liebskind R, Sjöberg J, Korpi ER, Liesi P: The Neuroprotective KDI Domain of γ 1-Laminin Is a Universal and Potent Inhibitor of Ionotropic Glutamate Receptors. *J Neurosci Res* 81: 797-804, 2005
- Nagai N, Urano T, Endo A, Takahashi H, Takada Y, Takada A: Neuronal degeneration and a decrease in laminin-like immunoreactivity is associated with elevated tissue-type plasminogen activator in the rat hippocampus after kainic acid injection. *Neurosci Res* 33: 147-154, 1999
- Nakagami Y, Abe K, Nishiyama N, Matsuki N: Laminin Degradation by Plasmin Regulates Long-Term Potentiation. *J Neurosci* 20: 2003-2010, 2000
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkilä RE: Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 36: 2503-2508, 1985
- Nielsen PK ja Yamada Y: Identification of Cell-binding Sites on the Laminin α 5 N-terminal Domain by Site-directed Mutagenesis. *J Biol Chem* 276: 10906-10912, 2001
- Nielsen PK, Gho YS, Hoffman MP, Watanabe H, Makino M, Nomizu M, Yamada Y: Identification of a Major Heparin and Cell Binding Site in the LG4 Module of the Laminin α 5 Chain. *J Biol Chem* 275: 14517-14523, 2000
- Nikonenko I, Nicolas T, Moosmayer M, Shigeri Y, Muller D, Jones LS: Integrins are involved in synaptogenesis, cell spreading, and adhesion in the postnatal brain. *Brain Res Dev Brain Res* 140: 185-194, 2003

- Nishimune H, Sanes JR, Carlson SS: A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature* 432: 580-587, 2004
- Nishimune H, Valdez G, Jarad G, Moulson CL, Müller U, Miner JH, Sanes JR: Laminins promote postsynaptic maturation by an autocrine mechanism at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 182: 1201-1215, 2008
- Nishiuchi R, Takagi J, Hayashi M, Ido H, Yagi Y, Sanzen N, Tsuji T, Yamada M, Sekiguchi K: Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: A comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ integrins. *Matrix Biol* 25: 189-197, 2006
- Noakes PG, Gautam M, Mudd J, Sanes JR, Merlie JP: Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin $\beta 2$. *Nature* 374: 258-262, 1995
- Nomizu M, Otaka A, Utani A, Roller PP, Yamada Y: Assembly of Synthetic Laminin Peptides into a Triple-stranded Coiled-coil Structure. *J Biol Chem* 269: 30386-30392, 1994
- Nomizu M, Kim WH, Yamamura K, Utani A, Song S-Y, Otaka A, Roller PP, Kleinman HK, Yamada Y: Identification of Cell Binding Sites in the Laminin $\alpha 1$ Chain Carboxyl-terminal Globular Domain by Systemic Screening of Synthetic Peptides. *J Biol Chem* 270: 20583-20590, 1995
- Ott U, Odermatt E, Engel J, Furthmayr H, Timpl R: Protease Resistance and Conformation of Laminin. *Eur J Biochem* 123: 63-72, 1982
- Pan T-C, Kluge M, Zhang R-Z, Mayer U, Timpl R, Chu M-L: Sequence of extracellular mouse protein BM-90/fibulin and its calcium-dependent binding to other basement-membrane ligands. *Eur J Biochem* 215: 733-740, 1993
- Parent A, Hazrati L-N: Functional anatomy of the basal ganglia. I. The Cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Rev* 20: 91-127, 1995
- Patton BL, Miner JH, Chiu AY, Sanes JR: Distribution and Function of Laminins in the Neuromuscular System of Developing, Adult, and Mutant Mice. *J Cell Biol* 139: 1507-1521, 1997
- Patton BL, Chiu AY, Sanes JR: Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic cleft. *Nature* 393: 689-701, 1998
- Patton BL, Cunningham JM, Thyboll J, Kortessmaa J, Westerblad H, Edström L, Tryggvason K, Sanes JR: Properly formed but improperly localized synaptic specializations in the absence of laminin $\alpha 4$. *Nat Neurosci* 4: 597-604, 2001

- Paxinos G ja Watson C: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4. painos. Academic Press, San Diego, Kalifornia, Yhdysvallat 1998
- Pedersen V, Schmidt WJ: The Neuroprotectant Properties of Glutamate Antagonists and Antiglutamatergic Drugs. *Neurotox Res* 2: 179-204, 2000
- Perese DA, Ulman J, Viola J, Ewin SE, Bankiewicz KS: A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Res* 494: 285-293, 1989
- Peters BR, Hartle RJ, Krzesicki RF, Kroll TG, Perini F, Balun JE, Goldstein IJ, Ruddon RW: The Biosynthesis, Processing, and Secretion of Laminin by Human Choriocarcinoma Cells. *J Biol Chem* 260: 14732-14742, 1985
- Philpot J, Cowan F, Pennock J, Sewry C, Dubowitz V, Bydder G, Muntoni F: Merosin-deficient congenital muscular dystrophy: the spectrum of brain involvement on magnetic resonance imaging. *Neuromuscul Disord* 9: 81-85, 1999
- Pillers D-AM, Weleber RG, Woodward WR, Green DG, Chapman VM, Ray PN: *mdx*^{Cv3} Mouse Is a Model for Electroretinography of Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 462-466, 1995
- Pini A, Merlini L, Tomé FMS, Chevallay M, Gobbi G: Merosin-negative congenital muscular dystrophy, occipital epilepsy with periodic spasms and focal cortical dysplasia. Report of three Italian cases in two families. *Brain Dev* 18: 316-322, 1996
- Podratz JL, Rodriguez E, Windebank AJ: Role of the Extracellular Matrix in Myelination of Peripheral Nerve. *Glia* 35: 35-40, 2001
- Poewe W: Treatments for Parkinson disease—past achievements and current clinical needs. *Neurology* 72(Suppl2): S65-S73, 2009
- Powell SK, Williams CC; Nomizu M, Yamada Y, Kleinman HK: Laminin-Like Proteins Are Differentially Regulated During Cerebellar Development and Stimulate Granule Cell Neurite Outgrowth In Vitro. *J Neurosci Res* 54: 233-247, 1998
- Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM: Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 67: 631-647, 1995
- Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U: Collagen IV is essential for basement-membrane stability but dispensable for initiation of its assemble during early development. *Development* 131: 1619-1628, 2004
- Pörsti E: Mikroglian merkitys Parkinsonin taudissa. Pro gradu, Helsingin yliopisto, Farmasian tiedekunta, Farmakologian ja toksikologian osasto, 2009

- Qu Q, Smith F: Neuronal migration defects in cerebellum of the Large^{myd} mouse are associated with disruptions in Bergmann glia organization and delayed migration of granule neurons. *Cerebellum* 4: 261-270, 2005
- Radakovits R, Barros CS, Belvindrah R, Patton B, Müller U: Regulation of Radial Glial Survival by Signals from the Meninges. *J neurosci* 29: 7694-7705, 2009
- Relucio J, Tzvetanova JD, Ao W, Lindquist S, Colognato H: Laminin Alters Fyn Regulatory Mechanisms and Promotes Oligodendrocyte Development. *J Neurosci* 29: 11794-11806, 2009
- Relucio J, Menezes MJ, Miyagoe-Suzuki Y, Shin'ichi Takeda: Laminin Regulates Postnatal Oligodendrocyte Production Promoting Oligodendrocyte Progenitor Survival in the Subventricular Zone. *Glia* 60: 1451-1467, 2012
- Relvas JB, Setzu A, Baron W, Buttery PC, LaFlamme SE, Franklin JM, ffrench-Constant C: Expression of dominant-negative and chimeric subunits reveals an essential role for $\beta 1$ integrin during myelination. *Curr Biol* 11: 1039-1043, 2001
- Robinson TE: Behavioral sensitization: Characterization of enduring changes in rotational behavior produced by intermittent injections of amphetamine in male and female rats. *Psychopharmacology* 84: 466-475, 1984
- Rosenblad C, Georgievska B, Kirik D: Long-term striatal overexpression of GDNF selectively downregulates tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal system. *Eur J Neurosci* 17: 260-270, 2003
- Rousselle P, Lunstrum GP, Keen DR, Burgeson RE: Kalinin: An Epithelium-Specific Basement Membrane Adhesion Molecule That Is a Component of Anchoring Filaments. *J Cell Biol* 114: 567-576, 1991
- Ryan MC, Tizard R, VanDevanter DR, Carter WG: Cloning of the LamA3 Gene Encoding the $\alpha 3$ chain of the Adhesive Ligand Epiligrin. *J Biol Chem* 269: 22779-22787, 1994
- Sasaki T, Timpl R: Domain IVa of laminin $\alpha 5$ chain is cell-adhesive and binds $\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ integrins through Arg-Gly-Asp. *FEBS letters* 509: 181-185, 2001
- Sasaki M, Yamada Y: The Laminin B2 Chain Has a Multidomain Structure Homologous to the B1 Chain. *J Biol Chem* 262: 17111-17117, 1987
- Sasaki M, Kato S, Kohno K, Martin GR, Yamada Y: Sequence of the cDNA encoding the laminin B1 chain reveals a multidomain protein containing cysteine-rich repeats. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 935-939, 1987
- Sasaki M, Kleinman HK, Deutzmann R, Yamada Y: Laminin, a Multidomain Protein. The A Chain Has a Unique Globular Domain and Homology with the Basement

Membrane Proteoglycan and the Laminin B Chains. *J Biol Chem* 263: 16536-16544, 1988

Sasaki T, Costell M, Mann K, Timpl R: Inhibition of glycosaminoglycan modification of perlecan domain I by site-directed mutagenesis changes protease sensitivity and laminin-1 binding activity. *FEBS Lett* 435: 169-172, 1998

Sasaki T, Göhring W, Mann K, Brakebusch C, Yamada Y, Fässler R, Timpl R: Short Arm Region of Laminin-5 γ 2 Chain: Structure, Mechanism of Processing and Binding to Heparin and Proteins. *J Mol Biol* 314: 751-763, 2001

Sauer H, Oertel WH: Progressive Degeneration of Nigrostriatal Dopamine Neurons Following Intrastratial Terminal Lesions with 6-hydroxydopamine: A Combined Retrograde Tracing and Immunocytochemical Study in the Rat. *Neuroscience* 59: 401-415, 1994

Sauer H, Rosenblad C, Björklund A: Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor β 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proc Natl Acad Sci* 92: 8935-8939, 1995

Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD: Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease. *J Neurochem* 54: 823-827, 1990

Schittny JC, Yurchenco PD: Terminal Short Arm Domains of Basement Membrane Laminin Are Critical for Its Self-assembly. *J Cell Biol* 110: 825-832, 1990

Sharif KA, Baker H, Gudas LJ: Differential regulation of laminin B1 transgene expression in the neonatal and adult mouse brain. *Neuroscience* 126: 967-978, 2004

Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang S-M, Goderie SK, Roysam B, Temple S: Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: A quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3: 289-300, 2008

Sievers J, Pehlemann FW, Gude S, Berry M: Meningeal cells organize the superficial glia limitans of the cerebellum and produce components of both the interstitial matrix and the basement membrane. *J Neurocytol* 23: 135-149, 1994

Smyth N, Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M, Edgar D: Absence of Basement Membranes after Targeting the *LAMC1* Gene Results in Embryonic Lethality Due to Failure of Endoderm Differentiation. *J Cell Biol* 144: 151-160, 1999

Smirnov SP, McDearmon EL, Li S, Ervasti JM, Tryggvason K, Yurchenco PD: Contributions of the Modules and Furin Processing to Laminin-2 Functions. *J Biol Chem* 277: 18928-18937, 2002

- Soen Y, Mori A, Palmer TD, Brown PO: Exploring the regulation of human neural precursor cell differentiation using arrays of signaling microenvironments. *Mol Syst Biol* 2: 37, 2006
- Spafford JD, Zamponi GW: Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery. *Curr Opin Neurobiol* 13: 308-314, 2003
- Su-Ming H, Raine L, Fanger H: Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A Comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981
- Sunada Y, Edgar TS, Lotz BP, Rust RS, Campbell KP: Merosin-negative congenital muscular dystrophy associated with extensive brain abnormalities. *Neurology* 45: 2084-2089, 1995
- Suzuki N, Yokoyama F, Nomizu M: Functional Sites in the Laminin Alpha Chains. *Connect Tissue Res* 46: 142-152, 2005
- Talts JF, Andac Z, Göhring W, Brancaccio A, Timpl R: Binding of the G domains of laminin $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains and perlecan to heparin, sulfatides, α -dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J* 18: 863-870, 1999
- Talts JF, Sasaki T, Miosge N, Göhring W, Mann K, Mayne R, Timpl R: Structural and Functional Analysis of the Recombinant G Domain of the Laminin $\alpha 4$ Chain and Its Proteolytic Processing in Tissues. *J Biol Chem* 275: 35192-35199, 2000
- Taniguchi Y, Ido H, Sanzen N, Hayashi M, Sato-Nishiuchi R, Futaki S, Sekiguchi K: The C-terminal Region of Laminin β Chains Modulates the Integrin Binding Affinities of Laminins. *J Biol Chem* 284: 7820-7831, 2009
- Terranova VP, Rao CN, Kalebic T, Margulies IM, Liotta LA: Laminin receptor on human breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 444-448, 1983
- Timpl R, Brown JC: Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 18: 123-132, 1996 ei viitattu vielä
- Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart J-M, Martin GR: Laminin-A Glycoprotein from Basement Membranes. *J Biol Chem* 254: 9933-9937, 1979
- Timpl R, Tisi D, Talts JF, Andac Z, Sasaki T, Hohenester E: Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol* 19: 309-317, 2000
- Tisi D, Talts JF, Timpl R, Hohenester E: Structure of the C-terminal laminin G-like domain pair of the laminin $\alpha 2$ chain harbouring binding sites for α -dystroglycan and heparin. *EMBO J* 19: 1432-1440, 2000

- Trapp BD, Nishiyama A, Cheng D, Macklin W: Differentiation and Death of Premyelinating Oligodendrocytes in Developing Rodent Brain. *J Cell Biol* 137: 459-468, 1997
- Tzu J, Marinkovich MP: Bridging structure with function: Structure, regulatory, and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 199-214, 2008
- Ungerstedt U: 6-hydroxy-dopamine Induced Degeneration of Central Monoamine Neurons. *Eur J Pharmacol* 5: 107-110, 1968
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW: Quantitative Recording of Rotational Behavior in Rats After 6-hydroxy-dopamine Lesions of the Nigrostriatal Dopamine System. *Brain Res* 24: 485-496, 1970
- Utani A, Nomizy M, Timpl R, Roller PP, Yamada Y: Laminin Chain Assembly. Specific Sequences at the C Terminus of the Long Arm are Required for the Formation of Specific Double- and Triple-stranded Coiled-coil Structures. *J Biol Chem* 269: 19167-19175, 1994
- Utani A, Nomizu M, Yamada Y: Fibulin-2 Binds to the Short Arms of Laminin-5 and Laminin-1 via Conserved Amino Acid Sequences. *J Biol Chem* 272: 2814-2820, 1997
- Utani A, Nomizu M, Matsuura H, Kato K, Kobayashi T, Takeda U, Aota S, Nielsen PK, Shinkai H: A Unique Sequence of the Laminin $\alpha 3$ G Domain Binds to Heparin and Promotes Cell Adhesion through Syndecan-2 and -4. *J Biol Chem* 276: 28779-28788, 2001
- van Reeuwijk J, Janssen M, van den Elzen C, Beltran-Valero de Bernabé D, Sabatelli P, Merlini L, Boon M, Scheffer H, Brockington M, Muntoni F, Huynen MA, Verrips A, Walsh CA, Barth PG, Brunner HG, van Bokhoven H: POMT2 mutations cause α -dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 42: 907-912, 2005
- Väänänen AJ, Rauhala P, Tuominen RK, Liesi P: KDI Tripeptide of $\gamma 1$ Laminin Protects Rat Dopaminergic Neurons From 6-OHDA Induced Toxicity. *J Neurosci Res* 84: 655-665, 2006
- Villanova M, Malandrini A, Sabatelli P, Sewry CA, Toti P, Torelli S, Six J, Scarfó G, Palma L, Muntoni F, Squarzoni S, Tosi P, Maraldi NM, Quazzi GC: Localization of laminin $\alpha 2$ chain in normal human central nervous system: an immunofluorescence and ultrastructural study. *Acta Neuropathol* 94: 567-571, 1997
- Watson PMD, Humphries MJ, Relton J, Rothwell NJ, Verkhatsky A, Gibson RM: Integrin-binding RGD peptides induce rapid intracellular calcium increases and MAPK signaling in cortical neurons. *Mol Cell Neurosci* 34: 147-154, 2007

West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG: Unbiased Stereological Estimation of the Total Number of Neurons in the Subdivisions of the Rat Hippocampus Using the Optical Fractionator. *Anat Rec* 231: 482-497, 1991

Wiksten M, Väänänen A, Liebkind R, Rauhala P, Liesi P: Soluble KDI Domain of γ 1 Laminin Protects Adult Hippocampus From Excitotoxicity of Kainic Acid. *J Neurosci Res* 78: 411-419, 2004a

Wiksten M, Väänänen A, Liebkind R, Rauhala P, Liesi P: Regeneration of Adult Rat Spinal Cord Is Promoted by the Soluble KDI Domain of γ 1 Laminin. *J Neurosci Res* 78: 403-410, 2004b

Wiksten M, Väänänen A, Liesi P: Selective Overexpression of γ 1 Laminin in Astrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis Indicates an Involvement in ALS Pathology. *J Neurosci Res* 88: 2045-2058, 2007

Wingate RJT: The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr Opin Neurobiol* 11: 82-88, 2001

Xie Z, Moy LY, Sanada K, Zhou Y, Buchman JJ, Tsai L-H: Cep120 and TACCs Control Interkinetic Nuclear Migration and the Neural Progenitor Pool. *Neuron* 56: 79-93, 2007

Yamamoto T, Shibata N, Kanazawa M, Kobayashi M, Komori T, Ikeya K, Kondo E, Saito K, Osawa M: Localization of laminin subunits in the central nervous system in Fukuyama congenital muscular dystrophy: an immunohistochemical investigation. *Acta Neuropathol* 94: 173-179, 1997

Yan HHN, Cheng CY: Laminin α 3 Forms a Complex with β 3 and γ 3 Chains That Serves as the Ligand for α 6 β 1-Integrin at the Apical Ectoplasmic Specialization in Adult Rat Testes: *J Biol Chem* 281: 17286-17303, 2006

Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong Y-P, Rangwala R, Procter TM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Miner JH, Sherman LS, Gold BG, Patton BL: Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. *J Cell Biol* 168: 655-666, 2005

Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, Inazu T, Mitsunashi H, Takahashi S, Takeuchi M, Herrmann R, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Toda T, Endo T: Muscular Dystrophy and Neuronal Migration Disorder Caused by Mutations in a Glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 1: 717-724, 2001

Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, Kawabata S, Kikuchi A, Kaibuchi K: GSK-3 β Regulates Phosphorylation of CRMP-2 and Neuronal Polarity. *Cell* 120: 137-149, 2005

Yu H, Talts JF: β 1 Integrin and α -dystroglycan binding sites are localized to different laminin-G-domain-like (LG) modules within the laminin α 5 chain G domain. *Biochem J* 371: 289-299, 2003

Yurchenco PD, Tsilibary EC, Charonis AS, Furthmayr H: Laminin Polymerization *in Vitro*. Evidence for a Two-step Assembly with Domain Specificity. J Biol Chem 260: 7636-7644, 1985

Yurchenco PD, Amenta PS, Patton BL: Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. Matrix Biol 22: 521-538, 2004

Zaccaria ML, Tommaso FDI, Brancaccio A, Paggi P, Petrucci TC: Dystroglycan distribution in adult mouse brain: A light and electron microscopy study. Neuroscience 104: 311-324, 2001

Zuddas A, Oberto G, Vaglini F, Fascetti F, Fornai F, Corsini GU: MK-801 Prevents 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Parkinsonism in Primates. J Neurochem 59: 733-739, 1992